

**Aus der Abteilung für Neuroradiologie am Institut für Radiologische Diagnostik
der
Universität München**

Leiter: Professor Dr. med. H. Brückmann

**Nachweis von saurem glialen Faserprotein (GFAP) in humanem Serum und erste
klinische Ergebnisse**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Olaf Magerkurth**

**aus
München**

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München**

Berichterstatter: **Professor Dr. med. H. Brückmann**

Mitberichterstatter: **Professor Dr. Dr. S. Boos**_____

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** **PD Dr. U. Missler**_____

Dekan: **Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter** __

Tag der mündlichen Prüfung: **20.11.2003**_____

Man soll an der Natur nicht verzweifeln: Vielleicht entwickelt sie aus dem Känguruh noch den Fußgänger des einundzwanzigsten Jahrhunderts.

Jaques Tati (1908 - 1982)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	7
2. Fragestellung	9
3. Einleitung	9
3.1 Das saure gliale Faserprotein (GFAP)	9
3.1.1. GFAP ist ein Mitglied der Intermediärfilament-Proteine	13
3.1.2. Lokalisation von GFAP	15
3.1.3. Aggregation von GFAP	16
3.1.4. Abbau von GFAP	18
3.1.5. Regulation der GFAP-Synthese	19
3.2. Astrozyten und gliale Filamente	21
3.2.1. Embryonale Entwicklung	21
3.2.2. Astrozyten und ihre Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen	23
3.2.3. Mechanische Funktion und Reparatur von Gewebe	23
3.2.4. Beteiligung am Immunsystem	26
3.2.5. Bildung der Blut-Hirn-Schranke	27
3.2.6. Neurotrophische Unterstützung	30
3.2.7. Kontrolle von Neurotoxinen	32
4. GFAP Messungen in der Literatur	34
5. Das S-100 Protein	36
5.1 S-100 Messungen in der Literatur	36
6. Material und Methode	37
6.1. Material und Methode (GFAP)	37

6.1.1	Messmethode für GFAP	37
6.1.2.	Plattenbeschichtung	38
6.1.3.	Biotinylierung des 2. Antikörpers	38
6.1.4.	Markierung des Streptavidin mit Europium	39
6.1.5.	Herstellung des TRIS/HCl/NaCl-Puffers	39
6.1.6	Herstellung des Waschpuffers	39
6.1.7.	Herstellung der Enhancement-Lösung	39
6.1.8	Standard	40
6.1.9	Herstellung der Kalibrierungslösungen	40
6.1.10	Assaybeschreibung für das GFAP	40
6.2.	<i>Material und Methode für das S-100</i>	41
6.2.1.	Messmethode für das S-100 Protein	41
6.3.	<i>Probenasservation und Lagerung</i>	41
6.4.	<i>Kollektive</i>	41
6.4.1	Referenzkollektiv	41
6.4.2	Patientenkollektiv und Blutentnahmen	42
6.5	<i>Statistische Methoden</i>	42
7.	Ergebnisse	43
7.1.	<i>Assaycharakteristik für das GFAP</i>	43
7.1.1	Standardkurve	43
7.1.2	Untere Nachweisgrenze	44
7.1.3.	Spezifität der Messmethode	44
7.1.4.	Präzisionsprofile	44
7.1.5.	Linearität des Assays	45

7.1.6. Wiederfindung	46
7.1.7. Stabilität von GFAP im Serum	48
7.1.8. Verhalten des Assays bei hohen GFAP-Konzentrationen	49
7.1.9. Referenzwert von GFAP im Blut	49
7.2. Klinische Studie	51
8. Diskussion	52
8.1 Messmethode	52
8.2 Klinische Studie	55
9. Schlußfolgerung und Ausblick	57
10. Zusammenfassung	58
11. Danksagung	63
12. Verzeichnisse	64
12.1. Verzeichnis der Tabellen	64
12.2. Verzeichnis der Abbildungen	65
12.3. Literaturverzeichnis	66
13. Lebenslauf	92

1. Vorwort

Das Fundament der Diagnostik und Therapie zentralnervöser Erkrankungen besteht im wesentlichen aus 3 Komponenten.

Die wichtigste Komponente ist die klinisch neurologische Untersuchung des Patienten. Bei bewußtlosen oder bewußtseinsgestörten Patienten gelangt man jedoch schnell an die Grenzen ihrer Aussagekraft.

Ein bedeutender Fortschritt in Diagnostik und Therapiekontrolle konnte mit bildgebenden Verfahren erzielt werden. Nach Einführung der Computertomographie wurde es erstmals möglich nichtinvasiv intrakranielle Strukturen zu differenzieren. Es konnte sowohl der knöcherne Anteil, als auch der parenchymatöse Anteil gut unterschieden werden. Bis heute hat sie insbesondere in der Neurotraumatologie und zur Diagnostik von intrakraniellen Blutungen, eine eminente Bedeutung. Ein weiterer Vorteil sind sehr kurze Untersuchungszeiten und die vielerorts gute Verfügbarkeit. In den letzten Jahren eröffnete die Kernspintomographie völlig neue Möglichkeiten der Bildgebung. Es ist nun möglich multiplanare und dreidimensionale Darstellungen des Zentralnervensystems zu erstellen. Ein weiterer Fortschritt ist die Darstellung intrakranieller Gefäße und damit verbundener Erkrankungsbilder in gutem Weichteilkontrast. Neuerdings können mittels funktioneller Methoden (Diffusions-MRI, Perfusions-MRI) auch die regionale Durchblutung, sowie akute Ischämien in einzelnen Arealen erfaßt werden. Diese Untersuchungen sind jedoch relativ empfindlich gegen Bewegungsartefakte und bei unruhigen Patienten schlecht durchführbar. Der Transport von intensivmedizinischen Patienten zum Untersuchungsgerät stellt eine Belastung und Gefährdung für den Patienten dar und ist mit einem relativ großen Aufwand verbunden.

Die dritte Komponente besteht in nuklearmedizinischen und laborchemischen Verfahren zur Diagnostik und Verlaufskontrolle neurologisch-neurochirurgischer Krankheitsbilder. Die Positronenemissionstomographie (PET) erlaubt eine Bestimmung des zerebralen Metabolismus. Allerdings ist mit dieser nur eine semiquantitative Messung möglich.

Die neurologische Labordiagnostik stützt sich hauptsächlich auf die Liquordiagnostik. Hier werden zum Beispiel das Gesamteiweiß und die Zellzahl routinemäßig untersucht. Über 80% des Eiweißes stammen aus dem Serum. Die ortsständigen Proteine sind β -trace-Protein, das Präalbumin und das t-Globulin. Des Weiteren werden Angiotensin Converting Enzyme (ACE), autochthone Immunglobuline, Lactat und Glucose bestimmt. Diese Parameter erlauben Rückschlüsse auf Genese und Differenzierung verschiedener zentralnervöser Erkrankungen. Die Gewinnung von Liquor ist ein relativ invasives Verfahren und ist bei supratentoriellen intrakraniellen Drucksteigerungen kontraindiziert.

Seit Jahrzehnten wird versucht, spezifische Proteine oder Peptide zu bestimmen, deren Konzentrationsänderungen im Liquor und/oder im Blut eine diagnostische Aussage über den Zustand des ZNS, bzw. über das quantitative Ausmaß eines Schadens des Gehirns- und des Rückenmarks zulassen. Besonders häufig und intensiv wurde bisher das S-100B Protein, die Neuronenspezifische Enolase (NSE), das basische Myeloprotein (MBP) und das saure gliale Faserprotein (GFAP) untersucht.

In dieser Arbeit soll ein ergänzendes diagnostisches Verfahren zur Erfassung der Schwere einer Schädigung des Zentralnervensystems vorgestellt werden. Es wurde eine Methode entwickelt mit der saures gliales Faserprotein (GFAP) quantitativ im Blut

erfaßt werden kann. Mit dieser Methode sind auch engmaschige Therapie- und Verlaufskontrollen möglich.

2. Fragestellung in der vorgelegten Arbeit

S-100B und NSE gelten als viel versprechende Parameter zur Erfassung von Hirnschädigung. Da jedoch beide Proteine nicht hirnspezifisch sind [255], haben sie bei nicht ausschließlich das ZNS betreffende Erkrankungen nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Daher wurde mit der Entwicklung des GFAP-Assays begonnen. Als die hier vorgestellte Arbeit zur Messung des GFAP begann, gab es kein kommerzielles Messbesteck. Es wurde daher eine eigene nichtisotopische Meßmethode für das GFAP im Liquor, aber insbesondere im Blut, entwickelt.

Im folgenden stelle ich eine Methode zur Messung von GFAP-Konzentrationen in humanem Blut mit Hilfe eines zeitverzögerten Immunfluoreszenzassays (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay = DELFIA) vor.

Es wurden mit der Meßmethode zur Quantifizierung von GFAP folgende Patientenkollektive untersucht: 70 gesunde Blutspender und 25 Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma.

3. Einleitung

3.1. Das saure gliale Faserprotein (GFAP)

Der deutsche Pathologe Rudolf Virchow gebrauchte 1846 erstmalig den Begriff Neuroglia. Virchow prägte diesen Begriff zur Beschreibung von Hirngewebe, das sich zwischen den Neuronen befindet. Er nahm an, daß es die gleiche Funktion erfüllt wie das Bindegewebe in anderen Organen.

Der Nachweis solcher nichtneuronalen Zellen wurde durch die 1870 von Golgi entwickelten histologischen Färbetechniken möglich. Die spanischen Neuroanatomen Ramon y Cajal und de Hortega entwickelten diese auf Metallimprägnation beruhende Technik weiter und erstellten ein System zur Klassifikation von Gliazellen, daß bis heute weitgehend unverändert besteht.

Gliazellen werden in drei Kategorien eingeteilt: der epitheliale Typ, Neuroglia und periphere Glia. Ependymale Zellen und Zellen im Plexus choroideus gehören zum epithelialen Typ, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen zu den Neuroglia und Schwann Zellen und Satellitenzellen zu den peripheren Glia.

Astrozyten existieren in zwei Hauptformen. Protoplasmatische Astrozyten findet man hauptsächlich in der grauen Substanz. Sie sind durch reichlich granuliertes Zytoplasma und zahlreiche dicke Fortsätze charakterisiert. Fibröse Astrozyten kommen in der weißen Substanz vor und besitzen lange, relativ dünne, unregelmäßig verzweigte Erweiterungen. Im Zytoplasma finden sich fibrilläre Strukturen.

Die Entdeckung von saurem glialen Faserprotein (GFAP) im Jahre 1971 durch Eng war ein Meilenstein in der weiteren Erforschung der Funktionen von Astrozyten. GFAP kommt nur in Astrozyten vor und ist ein wertvoller biochemischer Marker für ihre Identifikation. Die meisten Arbeiten zur Erforschung der Funktion von Astrozyten sind nur aufgrund dieser eindeutigen Möglichkeit der Identifikation von GFAP überhaupt möglich gewesen.

1971 isolierte Eng ein saures Protein aus Multiple Sklerose Plaques mit einer schweren fibrösen Sklerose. Dieses Protein wurde als Hauptbestandteil von astrozytären Filamenten angesehen [80] und als saures gliales Faserprotein (GFAP) bezeichnet [234]. Zuvor wurde bereits von Mori ein Protein, 10B

oder Astroprotein beschrieben, daß spezifisch für Astrozyten zu sein schien. Es wurde später als GFAP identifiziert [169]. Die ZNS-spezifischen Proteine α -Albumin und NSA-1 sollen ebenfalls dem GFAP entsprechen [76].

Die Gewinnung von GFAP aus normalem Gewebe stellte sich wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit, der Tendenz zu aggregieren, sich mit anderen sauren Proteinen zusammenzulagern, als schwierig dar [76]. Hinzu kommt, daß die Gewinnung von GFAP durch die Verunreinigung mit anderen Proteinen des Zytoskeletts, wie Tubulin [117] und Neurofilamentproteinen [251] oder durch seine Abbauprodukte [234] erschwert war. Verbesserungen bei der Reinigung von GFAP [78], wie die Immunaффinitäts-Chromatographie [208], die Isolierung von Intermediärfilamenten [54] und die Abtrennung von GFAP von Neurofilamentproteinen [142], haben die Schwierigkeiten der GFAP-Isolierung überwunden und die Kontamination mit anderen Proteinen des Zytoskeletts reduziert.

Die Aminosäuresequenz von Mäuse- und Menschen-GFAP wurde von geklonten DNA-Fragmenten von Lewis [141] bzw. von Reeves [198] hergeleitet. Die DNA-Sequenz von Maus-GFAP wurde auch von Balcarek und Cowan beschrieben [16].

Es wurde für das Molekulargewicht eine große Bandbreite von 40-60 kDa angegeben [169]. Diese großen Unterschiede hängen von labortechnischen Unterschieden in der SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulphate-poyacrylamide Gel Elektrophorese) und/oder in Unterschieden zwischen käuflich erhältlichen Proteinen, die zur Bestimmung des Molekulargewichts verwendet werden, ab. Ähnlichkeiten in der Primärstruktur mit verschiedenen Intermediärfilament-Untereinheiten [36] könnten ebenfalls der Grund sein, daß sie mit GFAP verwechselt wurden. Ebenso scheinen GFAP-Abbauprodukte die Bestimmung des Molekulargewichts zu beeinträchtigen [62, 234]. Es wird jetzt

allgemein angenommen, daß GFAP ein einzelnes Protein mit einer molekularen Masse von 50 ± 1 kDa darstellt [251].

Die Ladung von GFAP wurde als sehr heterogen beschrieben und der isoelektrische Punkt liegt in einem Bereich von 5,6-5,8 [22, 25]. Die Autoren vermuteten, daß posttranslationale Ereignisse für diese Heterogenität verantwortlich waren. Tatsächlich wurde GFAP auch in einer phosphorylierten Form gefunden, wie sie auch in anderen Klassen der Intermediärfilamente zuvor gesehen wurde [44]. Andererseits ist GFAP sehr empfindlich gegenüber einer Ca^{++} -abhängige Protease und es wurde im Rahmen der Proteolyse eine Verschiebung des isoelektrischen Punkts in den sauren Bereich beobachtet [8, 65]. Außerdem berichtet Yang [249], dass GFAP Kalzium-bindende Stellen und einige intermediärfilamentähnliche Sequenzen besitzt, die für Veränderungen in der Tertiärform und folglich auch für die Lage des isoelektrischen Punktes verantwortlich sind. Insofern könnten diese metabolischen Veränderungen für die Heterogenität der Ladungen verantwortlich sein.

GFAP existiert in zwei Formen, wasserlöslich und nicht wasserlöslich [80]. Beide Formen reagieren mit GFAP-Antikörpern gegen die wasserlösliche Form [36]. Es wird also angenommen, daß wasserlösliches GFAP die nicht aggregierten Untereinheiten und die nicht wasserlösliche Form ein Bestandteil von glialen Filamenten darstellt. Seitdem GFAP-Abbauprodukte in der schwimmenden Fraktion [65] gefunden wurden, scheint es möglich, daß zumindest ein Teil der wasserlöslichen Form eine niedrigmolekulare Gattung des abgebauten GFAP darstellt. In normalen Geweben besitzt die wasserunlösliche Form des GFAP die größte immunologische Aktivität, während die der wasserlöslichen Form nur 15-20 % der Gesamtaktivität ausmacht [249].

3.1.1. GFAP ist ein Mitglied der Intermediärfilament-Proteine

Das Zytoskelett ist ein komplexes Netzwerk von Protein-Filamenten, das sich im gesamten Zytoplasma erstreckt und der Zelle ihre Form und Beweglichkeit gibt und ihre Differenzierung mitbestimmt. Mittels Elektronenmikroskopie wurden in höheren eukaryontischen Zellen vier große Filament-Systeme als das Zytoskelett identifiziert. Diese sind Mikrotubuli (25nm), Myosin-Filamente (15nm), Intermediär-Filamente (8-10nm) und Aktin-Filamente (6nm). Die einzelnen Untereinheiten von Mikrotubuli, Myosin-Filamenten und Aktin-Filamente sind α - (Mr 56 kDa) und β - (53 kDa) Tubuline, Myosin (200 kDa) und Aktin (43 kDa). Die Gruppe der Untereinheiten von Intermediär-Filamenten ist heterogener. Zu ihr gehören neben GFAP auch Desmin, Typ 1 und 2 Keratine, Neurofilament-Triplet-Proteine, nukleäres Lamin, Peripherin und Vimentin.

Die Intermediär-Filamente werden je nach Untereinheiten in Subklassen eingeteilt [137]. Desmin-Filamente (10nm) befinden sich hauptsächlich in glatten Muskel- und Herzmuskelzellen. Keratin-Filamente (8nm) befinden sich in Zellen epithelialen Ursprungs. Neurofilamente (10nm) konnten bisher nur in Neuronen nachgewiesen werden. Nukleäres Lamin [92] als Bestandteil nukleärer Lamina in eukaryontischen Zellen [72] und Peripherin in Neuronen des peripheren Nervensystems [193, 194] sind neuere Subklassen im Zytoplasma [139] und Zellkern [85, 161]. Vimentin-Filamente (10nm) erscheinen ubiquitär in einer Reihe von Zellen. Gliale-Filamente (8nm) sind bisher nur in Gliazellen und Zellen glialen Ursprungs gefunden worden.

Eukaryonten exprimieren oft gleichzeitig zwei Arten zytoplasmatischer Intermediär-Filamente. Diese existieren als Bestandteile von unfertigen Filamenten oder als Copolymere eines Filaments.

Alle Untereinheiten der Intermediär-Filamente werden von Mitgliedern der gleichen Multigenfamilie kodiert [16, 92] und erscheinen deshalb elektronenmikroskopisch ähnlich. Ihre Aminosäuresequenzen indizieren, daß jede Intermediärfilamentpolypeptidkette (Monomer) drei klardefinierte Domänen besitzt [90]. Diese sind ein nicht-helikales, amino-terminales Kopfstück variabler Länge, ein zentraler α -helikaler Abschnitt mit immer gleicher Länge und Sequenz und ein nicht-helikales, carboxyl-terminales Schwanzstück mit beträchtlichen Längenunterschieden zwischen den unterschiedlichen Intermediärfilamentproteinen.

Die Aminosäuren in der helikalen Domäne zeigen ein immer gleiches Bild: eine Wiederholung einer sieben Aminosäuren langen Sequenz mit hydrophoben Aminosäuren in der Position 1 und 4, die für die α -helikale Struktur verantwortlich sind. Die Doppelhelix wird durch zwei Monomere mittels hydrophobischer Seit-an-Seit-Interaktion des zentralen Abschnitts gebildet. Zwei Dimere bilden ein Protofilament. Das fertige Intermediärfilament mit 10 nm Durchmesser soll aus acht Protofilamenten bestehen. Das Review von Alberts [4] beschreibt ein Modell zur Zusammensetzung von Intermediärfilamenten.

Alle Untereinheiten der Intermediärfilamente scheinen in vivo und in vitro phosphoryliert zu werden [6, 16, 111]. Die Phosphorylierung spezifischer Orte in der amino-terminalen Domäne von Intermediärfilament-Proteinen wird als wichtiger Faktor bei der Regulation von Auf- oder Abbau von Intermediärfilamenten betrachtet [112, 113]. Es wird ebenfalls vermutet, daß die limitierte Proteolyse durch Ca^{++} -abhängige Proteasen, die das Kopfstück der Intermediärfilamentuntereinheiten entfernen, die Fähigkeit Filamente zu bilden beeinträchtigt [232].

Die molekularen Eigenschaften von GFAP entsprechen denen anderer Intermediärfilamentproteine. Unter pathologischen Bedingungen [27] und bei einer Akkumulation glialer Filamente zeichnet sich GFAP durch einen Anstieg aus [237].

3.1.2. Lokalisation von GFAP

Uyeda [234] zeigte, daß GFAP nur im Gehirn vorkommt. Elektronenmikroskopische Studien fanden GFAP in glialen Filamenten, die sich im Zytoplasma von Astrozyten und anderen Typen von Gliazellen befinden [210]. Die meisten Filamente in Astrozyten bestehen allerdings nicht nur aus GFAP, sondern auch aus Vimentin [208, 213, 252]. Tatsächlich wurden Copolymere aus GFAP und Vimentin in Intermediärfilamenten in Gliomzellen mittels Immunelektronenmikroskopie dargestellt [219]. Bjorklund [31], Calvo [45], Abnet [1] und Lopez-Munoz [152] zeigten ebenfalls, daß eine Vimentin/GFAP Coexpression existiert und sich Copolymere aus GFAP und Vimentin bilden können. Es wurde jedoch andererseits auch berichtet, daß Astrozyten in der granulären Schicht des Zerebellums ausschließlich GFAP enthalten und das die meisten Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem ausschließlich Vimentin enthalten [210].

Der Grund für diese Unterschiede im GFAP/Vimentin-Gehalt der einzelnen Zelltypen ist unbekannt. Lazarides [137] nimmt an, daß die Expression von Vimentin in einigen Gliazellen benötigt wird, um spezifisch die Struktur von glialen Filamenten zu verändern. Andere Untersucher folgerten, daß während der Zellreifung von Gliazellen im Rahmen der Entwicklung des Zentralnervensystems Vimentin durch GFAP ersetzt wird [231, 252]. Die Variabilität von GFAP- und Vimentin-Gehalt scheint dennoch mit dem Reifegrad der Gliazellen zusammenzuhängen.

Viele Studien haben bisher bewiesen, daß GFAP hauptsächlich in Astrozyten im Zentralnervensystem vorkommt [28, 155, 234]. GFAP kommt sowohl in protoplasmatischen, als auch in fibrösen Astrozyten vor [28]. Protoplasmatische Astrozyten enthalten wenig GFAP, fibröse hingegen enthalten im Zellkörper und in den Fortsätzen reichlich GFAP [28]. Die radialen Fasern von Bergmannzellen im zerebellären Kortex des Zerebellums, die zum Typ der fibrösen Gliazellen gehören, enthalten ebenfalls reichlich GFAP [8, 28, 231]. Deshalb wird GFAP als spezifischer Marker für Astrozyten angesehen und für das Studium von Astrozyten während der embryonalen Entwicklung und unter normalen und pathologischen Bedingungen herangezogen.

3.1.3. Aggregation von GFAP

Unter physiologischen Bedingungen existieren 80-85% des GFAPs in der wasserunlöslichen Form [77]. Dennoch steht die Synthese von GFAP in keinem direkten Zusammenhang mit der Bildung von glialen Filamenten, weil humane Neoplasien, Astroblastome [64] und Zellen von Ratten C-6 Gliomen [30] immunzytochemisch färbbares GFAP enthalten, obwohl keine glialen Filamente nachgewiesen werden können. GFAP wird perikarial im Zytoplasma von Astrozyten gebildet und von dort in die Zellfortsätze transportiert, wo es aggregiert und Bündel bildet [127]. Dieses wurde typischerweise in Bergmann-Glia im Zerebellum von Ratten gezeigt. Es wurde GFAP-mRNA im Perikarium nachgewiesen, während dort immunzytochemisch nur ein niedriger GFAP-Gehalt bestimmt werden konnte [8, 28, 155].

Demzufolge muß es Faktoren geben, die die Formation von glialen Filamenten vermitteln.

Es wurde vermutet, daß die Aggregation/Disaggregation von Desmin und Vimentin durch den Mechanismus der Phosphorylierung von bestimmten Orten im Kopfstück dieser Moleküle geregelt wird [81, 91, 112, 113]. Die ortspezifische Phosphorylierung führt zu einer instabilen Intermediärfilament-Untereinheit, eine Dephosphorylierung verursacht eine Depolymerisation dieser Filamente. Andererseits berichten Yang und Babitch [248], daß nach der Behandlung von GFAP mit alkalischer Phosphatase, dessen Fähigkeit zu aggregieren zwar leicht eingeschränkt war, aber daß die dephosphorylierte Form immer noch aggregationsfähig ist. Phosphorylierungen außerhalb der Kopfstücke zeigten keinen direkten Zusammenhang mit Einschränkungen bei der Filamentbildung.

Es wird angenommen, daß sich Phosphorylierungsstellen hauptsächlich im Schwanzstück befinden, welches reich an Serin und Threonin ist [248]. Die Widersprüche zwischen den Daten von Vimentin/Desmin und von GFAP können dadurch erklärt werden, daß der Mechanismus der Polymerisation von GFAP ein anderer ist, als der von Vimentin/Desmin und nur bis zu einem gewissen Grad mit einer Phosphorylierung einhergeht. Pollenz und Mc Carthy [192] unterstützen diese Annahme mit Experimenten an Astrozytenkulturen, die zeigen, daß die Phosphorylierung von GFAP von morphologischen Veränderungen, die mit einer Akkumulation von glialen Filamenten einhergehen, getrennt werden kann [237].

GFAP ist bei niedriger Ionenstärke wasserlöslich, zeigt aber bei steigender Ionenstärke eine starke Tendenz zu aggregieren. Zweifach geladene Kationen sind bei millimolaren Konzentrationen effektivere Promotoren bei der Bildung von glialen Filamenten, als einfach geladene Kationen [248]. Tatsächlich wurde bewiesen, daß GFAP drei Kationenbindungsstellen für zweifach geladene Kationen besitzt und daß

zweifachgeladene Kationen bei der Formation glialer Filamente strukturelle und regulatorische Funktionen übernehmen [249].

3.1.4. Abbau von GFAP

Die limitierte chymotryptische Spaltung entfernt die zwei Endstücke von GFAP und beläßt den Zentralabschnitt [209]. Die Zentralregion allein ist nicht in der Lage morphologisch erkennbare gliale Filamente zu bilden [248]. Dieselben Beobachtungen wurden mit anderen Intermediärfilament-Proteinen gemacht [90]. Yang und Babitch [248] schlagen vor, daß die Endstücke, insbesondere das Kopfstück zur Filamentbildung beitragen. Es ist bekannt, daß GFAP genau wie andere Intermediärfilamentproteine [93, 175] Ca^{2+} abhängig abgebaut wird [9, 59, 65]. Deshalb könnte, wie es bei anderen Intermediärfilament-Proteinen auch vermutet wird [232], Ca^{2+} -abhängige Protease das Kopfstück von GFAP entfernen und die Fähigkeit Filamente zu bilden beeinträchtigen. De Armond [65] zufolge ist Ca^{2+} -abhängige Protease an der Kontrolle des Umsatzes von glialen Filamenten beteiligt. In der Tat wurde in differenzierten Astrozyten, in denen die Filamentbildung beschleunigt sein soll, eine erhöhte Aktivität der Protease festgestellt [59].

Obwohl die biologische Halbwertszeit von GFAP in Astrozytenkulturen auf 7,5 bis 8 Tage geschätzt wird [53, 171], ist der in vivo Umsatz im Rückenmark von Mäusen wesentlich langsamer [66]. Auf dieser Basis ist der Abbau von GFAP sowohl in vivo [9], als auch in intakten Zellen [58] sehr schwer nachzuweisen.

Dennoch bewiesen Studien mit Präparaten aus erkranktem menschlichen ZNS-Gewebe [234] und mit Astrozytenkulturen [59] den Abbau. Niedrigmolekulare Abbauprodukte

von GFAP wurden ebenfalls in Kleinhirn-Homogenat von Gunn-Ratten mit umschriebenen Entwicklungsstörungen nachgewiesen [9].

Das legt nahe, daß zwei verschiedene Arten des GFAP-Abbaus existieren: in vitro/post mortem und in vivo/umsatzabhängig. Beide werden durch Ca^{2+} -abhängige Proteasen katalysiert. Im ersten Fall verlieren Astrozyten die Kontrolle über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und vollziehen einen Abbau von GFAP, der in der Bildung von Abbauprodukten kleinerer Molekülmasse und oder sogar dem Verschwinden von GFAP mündet. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Schlaepfer und Zimmermann [212] überein, daß ein Kalzium-Einstrom zu einem Verlust von glialen Filamenten und zu deren Ersatz mit amorphen granulärem Material führt. Demzufolge sollte in vivo, wo die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration geregelt wird, nur eine limitierte Proteolyse stattfinden.

GFAP verändert seinen isoelektrischen Punkt in Anwesenheit von Ca^{2+} und einigen Proteaseinhibitoren in den sauren Bereich (Punkt A) [9]. Der Punkt A wird in der wasserlöslichen Form gemessen und scheint sensibler auf Ca^{2+} -abhängige Proteasen zu sein. Wie bereits zuvor erwähnt, wird die Bildung von glialen Filamenten durch Ca^{2+} beschleunigt. Demzufolge kann Ca^{2+} in vitro sowohl die Bildung von glialen Filamenten beschleunigen, als auch den GFAP-Abbau in Bewegung setzen. Es ist jedoch unklar, ob diese in vitro Prozesse ebenfalls in vivo stattfinden.

3.1.5. Regulation der GFAP-Synthese

Der Anstieg von GFAP in Astrozyten wird bei zahlreichen traumatischen Läsionen, entzündlichen Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen histochemisch und biochemisch erfaßt. Genetisch veränderte Tiere mit neurologischen

Veränderungen wie zitternde Mäuse [164], torkelnde Mäuse [7, 8], gestreifte Mäuse [218] und Gunn Ratten [7, 8, 10, 120, 181] zeigen in Homogenaten und immunhistochemischen Präparaten alle hohe GFAP-Spiegel in den betroffenen Hirnregionen. Ein hoher GFAP-Spiegel im ZNS ist charakteristisch für seine Schädigung, ganz gleich welcher Pathogenese. Dieses legt nahe, daß verschiedene Faktoren direkt oder indirekt die Regulation der GFAP-Synthese in Astrozyten beeinflussen können.

Mehrere Hormone und Wachstumsfaktoren regulieren den GFAP-Gehalt in Astrozytenkulturen [53, 171]. Hormone wie Hydrokortison und Prostaglandin F-2a können die Synthese von GFAP induzieren [171]. Folgende Wachstumsfaktoren haben ebenfalls eine Wirkung auf Astrozyten: Glia-Wachstumsfaktor (Glia Growth Factor: GGF) [43], Glia-Reifungsfaktor (Glia Maturation Factor: GMF) [144], GMFb [143], Astrozyten Wachstumsfaktor (Astrocyte Growth Factor: AGF) [191], Platelet-derived Growth Factor (PDGF) [241], Fibroblasten Wachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor: FGF) [171], hirnständiger Wachstumsfaktor (Brain Derived Growth Factor: BDGF) [216] und Interleukin I [95].

GGF und Interleukin I fungieren als Mitogen, während GMFb als Differenzierungsfaktor wirkt. GMF, AGF und FGF sollen beide Eigenschaften besitzen. PDGF und BDGF scheinen zusätzlich zur Mitogenität [23, 241] und zur Wirkung als Differenzierungsfaktor [23] noch als chemischer Anziehungstoff zu wirken [40]. Perraud [188] berichtet zudem, daß verschiedene Protease-Inhibitoren ebenso die Proliferation von Ratten-Astrozyten stimuliert haben. Viele andere Faktoren aus dem Gehirn, Kulturmedium und Serum haben ebenfalls mitogene Eigenschaften und/oder wirken als Differenzierungsfaktoren auf Astrozyten.

Evans [82] berichtet, daß einige Peptidhormone einen Anstieg von zyklischem AMP (cAMP) in Astrozytenkulturen bewirken. GMF, ein Induktor der GFAP-Synthese [123], erhöht ebenfalls die cAMP-Konzentration in Glioblasten-Kulturen [146]. Ein Analogon von cAMP, das dBcAMP, induziert umschriebene morphologische [145] und biochemische [217] Veränderungen in Astrozyten. Solche dBcAMP induzierten zuvor flachen polygonalen Zellen nehmen eine sternförmige Form an, ähnlich wie reaktive Astrozyten und enthalten hohe Mengen an GFAP.

3.2. Astrozyten und gliale Filamente

3.2.1. Embryonale Entwicklung

Während der embryonalen Entwicklung bilden Astrozyten ein Gerüst, an welchem die Neuronen entlangwachsen und so zu den richtigen Stellen gelangen. Dieser Effekt wurde erstmals von Eckenhoff [73] für einen bestimmten Typ von Nervenzelle, der Körnerzelle im Affen-Zerebellum, gezeigt. Die Körnerzellen wandern, unterstützt durch lange Fasern von radialen Gliazellen, den Bergmannglia, von den äußeren Schichten des sich entwickelnden Kleinhirns nach innen. Smith [221] zeigte in Experimenten, daß in Mäusegehirnen eine Schlinge bestehend aus Astrozyten, das Wachstum von Axonen von einer Hemisphäre zur anderen unterstützt und mit diesem Vorgang das Corpus callosum ausgebildet wird. Bei Tieren, die diese Schlinge nicht besitzen, findet keine Ausbildung des Corpus callosum statt. Nach Implantation eines Kunststoffmaterials, auf dem Astrozyten wachsen können, konnten sich die Axone ausbilden und ein neues Corpus callosum bilden.

In folgenden Studien wurden auf der Grundlage von immunzytochemischen Methoden die Expression von GFAP während der Entwicklung des ZNS untersucht:

Bei Ratten und Mäusen ist die Expression von GFAP hauptsächlich ein postnatales Phänomen. Während der embryonalen Phase zeigten sich mittels Immunfluoreszenz am Tag 18 wenig zerstreutes GFAP in der Peripherie des Rückenmarks [195] und in der medialen Wand des lateralen Ventrikels [26]. In Zellsuspensionen von embryonalen Rattengehirnen, Tag 16-19, wurden sehr wenige GFAP positive Zellen gefunden [2]. Einige Tage nach der Geburt können jedoch immunzytochemisch GFAP in der subkortikalen und zerebellären weißen Substanz, in subpialen und supraventrikulären Regionen, sowie in den zerebellären Bergmann Glia nachgewiesen werden [26, 37].

Bei Primaten wird GFAP während des ersten Drittels der Gestation exprimiert [55, 140]. Deshalb sind beim Rhesusaffen und im menschlichen Gehirn radiale Gliazellen GFAP-positiv, während sie es in pränatalen radialen Gliazellen von Ratten nicht sind. Der Zeitunterschied im Auftauchen von GFAP indiziert, daß die GFAP-Expression nicht nur von den Hauptphänomenen neuronale Wanderung, axonalem Wachstum oder Myelinisierung während der Entwicklung abhängt. Andere Faktoren wie Hormone und die extrazelluläre Matrix der subpialen und vaskulären Basallaminae können ebenfalls potentielle Stimuli sein. Unterschiede zwischen den Spezies können aber auch damit begründet werden, daß die GFAP-Expression unabhängig von anderen molekularen Charakteristika der radialen Gliazellen oder Astrozyten reguliert wird.

Ganz im Gegensatz dazu stehen neuere Ergebnisse von Pekny [187]. Sie zeigen, daß sich GFAP-Gen-negative Mäuse normal entwickeln, das Erwachsenenalter erreichen und sich normal fortpflanzen. Sie zeigen keine Auffälligkeiten im Verhalten, in ihrer Beweglichkeit und in Ihrem Gedächtnis. Außerdem wurden keine Abnormalitäten in der histologischen Struktur des ZNS und der Blut-Hirn-Schranke gefunden.

3.2.2 Astrozyten und ihre Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften von Astrozyten ist ihre ausgeprägte Antwort auf neurologische Ereignisse. Die astrogliale Reaktion tritt schnell auf und kann bereits innerhalb einer Stunde nach einem fokalen mechanischem Trauma nachgewiesen werden [173].

Die ausgeprägten astroglialen Reaktionen bei verschiedensten neurologischen Erkrankungen, ihre Schnelligkeit und das evolutionäre Fortbestehen von reaktiver Astrozytose legen nahe, daß sie eine wichtige Funktion im ZNS darstellt. Allerdings bleibt die genaue Rolle von Astrozyten bei Vorgängen nach Verletzungen des ZNS bis heute schwer faßbar.

Die Umwandlung von Astrozyten vom ruhenden in den aktivierten Zustand geht mit zum Teil dramatischen Veränderungen einher, die folgende Funktionen erfüllen sollen:

- Mechanische Funktionen und Reparatur von Gewebe
- Beteiligung am Immunsystem
- Bildung der Blut-Hirn-Schranke
- Neurotrophische Unterstützung
- Kontrolle von Neurotoxinen

3.2.3. Mechanische Funktionen und Reparatur von Gewebe

Es bleibt bis heute unklar, ob die astrogliale Reaktion eine nützliche ist oder ob sie von schädlicher Natur ist [200]. Es ist denkbar, daß das Ansteigen zytoskelettärer Proteine in den reaktiven Astrozyten ein Zeichen darstellt, nach Verletzung die Wundheilung

durch Stabilisierung des umgebenden Gewebes zu unterstützen. Die gliale Narbe, die durch reaktive Astrozyten gebildet wird, könnte ebenfalls dazu dienen nekrotisches Gewebe zu entfernen und den entstehenden Raum nach neuronalem Verlust aufzufüllen [199].

Andererseits kann genau diese gliale Narbe auch regenerative Prozesse wie ein einsprossen neuronaler Fortsätze in das verletzte Gebiet verhindern [199, 201]. Zentrale Neuronen regenerieren sich nicht ausreichend nach einer Verletzung. Studien von Aguayo [3] führen dies nicht auf ein intrinsisches Unvermögen dieser Neuronen, sondern auf das sie umgebende Gewebe zurück. Elektronenmikroskopische Analysen von sich regenerierenden Axonen zeigen, daß die Blockierung des axonalen Wachstums im ZNS in unmittelbarer Umgebung von reaktiven Astrozyten auftritt [149]. Es wurde außerdem gezeigt, daß Astrozyten in vivo Moleküle exprimieren, die axonales Wachstum in vitro verhindern [162].

Während es in vivo schwierig zu beweisen ist, daß dichte gliale Narben nicht das axonale Wachstum mechanisch blockieren, gibt es in vitro Beweise, daß Astrozyten ihrerseits nicht notwendigerweise die Regeneration unterbinden [100, 156]. Reaktive Astrozyten verhindern nicht, daß PC12 Zellen, in Explantaten des optischen Nervs durch gliale Narben aussprossen [63]. In vivo Experimente von Kawaja [124] zeigen, daß in Anwesenheit von NGF (hergestellt durch transplantierte Fibroblasten), reaktive Astrozyten in der Tat ein Substrat für das Wachstum von sympathischen Neuriten liefern.

Daß reaktive Astrozyten bei der Regeneration und Reparatur von Gewebe eine Rolle spielen, wird durch ihr molekulares Profil belegt, das ihnen die Produktion von Bestandteilen extrazellulärer Matrix und ihre Interaktion mit dieser ermöglicht.

In vivo exprimieren Astrozyten Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Chondroitin-6-Sulfat, Proteoglykan und gliales Hyaluronadhäsionsprotein, einem hyaluronbindenden Protein. In vitro sind sie zusätzlich in der Lage Glycosaminglykane zu sezernieren [11, 118]. Reaktive Astrozyten können mit der extrazellulären Matrix und anderen Zellen des ZNS mittels Adhäsionsmolekülen wie embryonales neurales Zelladhäsionsmolekül und Zytotactin/Tenascin interagieren.

Transforming Growth Factor (TGF)- β -1 war in reaktiven Astrozyten nach Stichverletzungen des ZNS erhöht [150]. Logan [150] schlägt vor, daß von Astrozyten sezerniertes TGF- β -1 Fibroblasten in das geschädigte Gebiet anzieht, die Ausschüttung von extrazellulären Matrixproteinen und die Synthese von abbauenden Enzymen reguliert und eine Rolle bei der Angiogenese in der Narbe spielt. Folglich könnten Astrozyten wichtig für die kontrollierte Bildung von Narbengewebe und dessen Vaskularisation nach einer Verletzung sein.

Die Produktion von Proteasen und Proteaseinhibitoren könnte es den Astrozyten erlauben, die extrazelluläre Matrix in verletzten Arealen umzuwandeln und die Trümmer von degenerierenden Zellen zu beseitigen. Während die Aktivität solcher Moleküle einerseits die Wundheilung unterstützt, ist es aber andererseits auch möglich, daß astrogliale Proteasen oder Proteaseinhibitoren nachteilige Effekte in bestimmten pathologischen Zuständen haben. Zum Beispiel wird die Produktion von kalziumaktivierten Proteasen durch reaktive Astrozyten mit der Degeneration von Neuronen nach Ischämie und der Produktion von β -Amyloid, einem Protein das bei Patienten mit Morbus Alzheimer im Gehirn pathologisch akkumuliert, in Zusammenhang gebracht [196].

Die Zerstörung von Bahnen in der weißen Substanz des ZNS führt zu einer Freisetzung von großen Mengen von Myelinlipiden. Apo E (Apolipoprotein E) ist ein Hauptbestandteil von niedrig- und hochdichten Lipoproteinen und spielt eine wichtige Rolle im Fetttransport und -metabolismus. Im ZNS wird ApoE von Astrozyten produziert [39, 174, 227] und während der Astrozytose zeigt sich eine Erhöhung der astroglialen Expression von Apo E [67]. Astrozytäres ApoE scheint an der Abgabe von Lipiden an andere Zellen des ZNS zur Membranbiosynthese beteiligt zu sein und die Entsorgung von Cholesterin in die Peripherie zu erleichtern.

3.2.4. Beteiligung am Immunsystem

Eine der Hauptfunktionen von reaktiven Astrozyten ist die Initiierung der Immunantwort im ZNS [103]. Bei der Zugabe von γ -Interferon werden Astrozyten in vitro dazu angeregt, Moleküle wie zum Beispiel Major Histocompatibility Complex (MHC) Antigene und Adhäsionsmoleküle wie Intercellular Adhesion Molecule I zu produzieren. Diese beiden Moleküle sind an der Immunantwort beteiligt. Astrozytenkulturen sind in der Lage auf MHC Klasse I und Klasse II Antigene zu präsentieren und viele verschiedene Zytokine herzustellen [87, 88, 148, 229]. Zusätzlich haben einige immunhistochemische Studien in vivo gezeigt, daß wenige reaktive Astrozyten in pathologischen Zuständen MHC-Moleküle exprimieren. Zusammengefaßt unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, daß zum einen die Antigenpräsentation von MHC produzierenden Astrozyten und die astrogliale Produktion von Zytokinen eine zentrale Rolle in Interaktionen des Immunsystems spielen und zum anderen, daß Astrozyten kausal an der Pathogenese von mehreren immunvermittelten neurologischen Erkrankungen beteiligt sein können [84, 89, 103].

Neuere in vivo Experimente stellen allerdings die postulierten immunologischen Funktionen von Astrozyten in Frage. Während die Injektion von γ -Interferon in den Liquor eine ausgeprägte Induktion der MHC Klasse I und Klasse II auf Mikroglia bewirkt, wurde auf Astrozyten nur eine eingeschränkte Induktion von MHC-Molekülen festgestellt [236, 247]. Die systemische Injektion von γ -Interferon [135, 225] oder die intrazerebrale Injektion von Lipopolysacchariden induzierte ebenfalls hauptsächlich auf Mikroglia eine Expression von MHC Klasse II. Außerdem zeigen Studien bei experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE), amyotrophischer Lateralsklerose und intrazerebraler Transplantation von Allografts, daß Immuninteraktionen im ZNS vornehmlich von Mikroglia vermittelt werden [94, 105-107, 125, 135, 136, 157]. Diese Studien lassen den Schluß zu, daß Astrozyten möglicherweise doch nicht den Hauptteil der antigenpräsentierenden Zellen im ZNS darstellen und sprechen gegen Ihre Hauptrolle bei immunvermittelten neurologischen Erkrankungen. Astrozyten scheinen dennoch einen wichtigen regulatorischen Effekt auf entzündliche und immunologische Antworten im ZNS zu haben.

3.2.5. Bildung der Blut-Hirn-Schranke

Astrozyten sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Endothelzellen kleiden die Kapillaren in Form von losen Zellverbänden aus. Sie erlauben kleinen wasserlöslichen Substanzen, die sich im Blut befinden, ins Gewebe zu passieren. Im Gehirn jedoch sind in den Kapillaren die Endothelzellen durch tight-junctions “verbunden und für wasserlösliche Substanzen fast impermeabel. Diese Blut-Hirn-Schranke erlaubt den Erhalt eines konstanten chemischen Milieus im Gehirn, ist aber auch ein Hindernis bei der Therapie von Erkrankungen.

Die Interaktion des ZNS mit Faktoren und Zellen aus dem Blut sind von außerordentlicher Wichtigkeit für die Pathogenese einer Reihe neurologischer Erkrankungen. Diese Interaktionen werden teilweise von der Blut-Hirn-Schranke, gebildet durch einzigartige Fähigkeiten der Endothelzellen in den Kapillaren des ZNS, kontrolliert. Astrozyten stehen mit ihren Endfüßen in direktem Kontakt mit diesen Zellen [190] und es wurde mehrfach gezeigt, daß sie an der Kontrolle der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Reese und Brightman [41, 42, 197] widerlegten die Annahme, daß die Astrozyten selbst die Blut-Hirn-Schranke bilden. Sie zeigten, daß nur die Endothelzellen die Schranke bilden und daß Astrozyten lediglich die Bildung von tight-junctions und charakteristischen Enzymen induzieren.

Astrozyten könnten sowohl den Eintritt von Blutzellen, als auch ihre intraparenchymale Aktivität im ZNS mittels der Sekretion von Zytokinen beeinflussen. Astrozyten bilden in vitro eine große Anzahl von Zytokinen und inflammatorischen Mediatoren. Unglücklicherweise fehlt in vivo in den meisten Fällen die Bestätigung dieser Ergebnisse und es scheint, daß eine Kontamination der Astrozytenkulturen mit Mikroglia in vielen in vitro Studien nicht absolut ausgeschlossen wurde. Es existieren dennoch einige wenige in vivo Studien, die das Postulat unterstützen, daß astrogliale Zytokine an der Pathogenese von viral und immunologische vermittelten Erkrankungen beteiligt sind. Wahl [238] zeigte zum Beispiel, daß reaktive Astrozyten bei Infektionen des Gehirns mit Humanem Immundefizienz Virus I (HIV-I) TGF β bilden und spekuliert, daß dieses Zytokin die Rekrutierung von HIV-I infizierten Monozyten verstärkt. Demzufolge könnte die astrogliale TGF β die Veränderungen bei entzündlichen Veränderungen wie bei HIV-1 assoziierten Enzephalomyelitis und die Ausbreitung des blutständigen Virus in das ZNS verursachen. Es sollte jedoch in diesem Kontext gesagt werden, daß viele Zytokine eine Vielzahl von Funktionen übernehmen

[224] und daß das Verständnis ihrer Effekte im intakten ZNS des Erwachsenen gerade am Anfang steht [48]. Es ist deshalb keine Überraschung, daß die Wirkung von Zytokinen bei bestimmten neurologischen Krankheiten schwer vorherzusagen ist [29, 46, 116, 128].

Protease und Proteaseinhibitoren könnten von den Astrozyten verwendet werden, um die Konzentration einer Reihe von Proteinen im Parenchym, Zytokine und Proteasen aus dem Blut oder von anderen Gehirnzellen eingeschlossen, zu regulieren. Solch eine Rolle wird auch dem Proteaseinhibitor NEXIN I [56, 108], der bei reaktiven Astrozyten in immunhistochemischen Präparaten erhöht ist, zugeschrieben. In vitro durchgeführte Studien legen nahe, daß Protease-Proteaseinhibitor-Komplexe im Falle einer Verletzung die Synthese von Akutphaseproteinen induzieren [130, 133] und die gerichtete Wanderung von Neutrophilen stimulieren [17].

Bei Schädel-Hirn-Trauma und intrazerebraler Blutung ist die Blut-Hirn-Schranke des ZNS plötzlich unterbrochen. Diese Unterbrechung läßt Erythrozyten extravasal auftreten, die dort lysieren und eisenhaltige Bestandteile ins ZNS abgeben. Die Folgen solcher Läsionen sind die fokale Enzephalomalazie, Hämosiderinablagerungen und gelegentlich die Entwicklung von wiederholten epileptischen Anfällen. Aus tierexperimentellen Studien wird geschlossen, daß die klinische Abfolge des Schädel-Hirn-Traumas mit der Bildung von freien Radikalen aus Eisen des ausgetretenen Blutes zusammenhängt [244]. Die Expression von Transferrin, welches Eisen mobilisiert und transportiert und sein Rezeptor auf reaktiven Astrozyten [60, 97, 182] legen nahe, daß diese Zellen helfen können, überschüssige Eisenladungen aus der Umgebung der Läsion zu entfernen.

Die Blut-Hirn-Schranke schützt das ZNS vor toxischen Metallen, die im Blut vorkommen. Dennoch ist die Blut-Hirn-Schranke an einigen Stellen undicht [24]. In der Umgebung dieser Lecks findet man GFAP-positive Zellen, die als Gomori Astrozyten bezeichnet werden [211] und eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Toxizität von Metallen zu haben scheinen. Diese Zellen vermehren sich nach Bestrahlung [224] und akkumulieren Silber, Quecksilber und Blei nach systemischer Gabe dieser Substanzen [211]. Gomori Astrozyten exprimieren Metallothionin [254], ein Protein welches Schwermetalle, wie Cadmium und Quecksilber binden und es im weiteren Verlauf unschädlich machen kann. Das Protein kann durch Schwermetalle in verschiedenen Geweben induziert werden und es gibt Hinweise, daß dies in Astrozyten nach Gabe von Cadmium der Fall ist [177].

Gewebsfaktor oder Gewebsthromboplastin ist ein transmembranäres Glycoprotein, das als Initiator der extravaskulären Blutgerinnung fungiert. Im Hirngewebe wird der Gewebsfaktor hauptsächlich in Astrozyten exprimiert [74]. Astrozyten treten in Form von Endfüßen mit den Endothelzellen in Kontakt und es könnte es sein, daß der Gewebsfaktor den Astrozyten hilft einen hämostatischen Umschlag im das vaskuläre System des ZNS zu bilden. Die Steigerung der Expression des Gewebsfaktors durch reaktive Astrozyten in nichthämorrhagischen Bedingungen wie Scrapie läßt den Schluß zu, daß dieser Umschlag zusätzliche Funktionen innerhalb des ZNS erfüllt.

3.2.6. Neurotrophische Unterstützung

Obwohl es schon lange bekannt ist, daß Astrozyten Faktoren sezernieren, die in Kulturen explantierter Neuronen das Wachstum fördern und die Lebenszeit verlängern, konnte bislang nur eine geringe Anzahl von astroglialen Molekülen identifiziert werden, die trophische Effekte auf Neuronen ausüben [18]. Einige astrogliale neurotrophe

Faktoren scheinen direkt auf Neuronen zu wirken. Andere haben indirekt durch die Unterstützung anderer Zellen des ZNS eine fördernde Wirkung auf Neuronen. Sowohl Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor: NGF) und Fibroblastenwachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor: FGF) haben eine wachstumsfördernde Wirkung auf Neuriten und wirken auf einige Typen von Neuronen in Kulturen lebensverlängernd [170, 239, 250]. Astrozyten sind im Gegensatz zu Mikroglia in der Lage in vitro NGF zu produzieren [253]. Nach einem Trauma war sowohl im optischen Nerv als auch im Hippocampus das NGF erhöht [134, 154, 242] und in einer separaten Studie waren die zelluläre Quellen des NGF Astrozyten [15]. Astrozyten produzieren als Antwort auf verschiedene Faktoren in vitro ebenfalls FGF und bei Morbus Alzheimer wurde FGF den Astrozyten zugeordnet. Neuere Studien zeigen, daß Wachstumsfaktoren wie NGF und FGF in der Lage sind zentrale Neuronen gegen hypoglykämische/exotoxische Ereignisse zu schützen, indem sie neuronale Kalziumkonzentrationen stabilisieren [52, 159, 160]. Reaktive Astrozyten produzieren nach Ischämie insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1 (Insulin Like Growth Factor 1: IGF-1) [96, 138]. Weil IGF-1 neurotrophische Effekte hat, könnte diese astrogliale Antwort den Verlust von Neuronen verhindern [49, 96].

IGF-1 stimuliert die Entwicklung von Oligodendrozyten und Myelinisierung in vitro [172]. In Übereinstimmung mit der postulierten Rolle des IGF-1 bei der Myelinisierung verschwindet es selbst und sein Rezeptor im erwachsenen Gehirn fast vollständig [50]. Oligodendrozyten bilden am Ort der Läsion IGF-1-Rezeptoren. Reaktive Astrozyten exprimieren in diesem Areal gleichzeitig IGF-1. Dies legt den Schluß nahe, daß Astrozyten eine wichtige Rolle in der Remyelinisierung des ZNS spielen.

Dennoch wurde auch gezeigt, daß reaktive Astrozyten bei Multipler Sklerose in Läsionen Tumor Nekrose Faktor α (Tumor Necrosis Factor α : TNF α) exprimieren [109, 214]. Dieses Zytokin wirkt auf Oligodendrozyten toxisch [202, 215].

Es bleibt also weiterhin unklar, ob die Rolle von Astrozyten in entzündlichen demyelinisierenden Prozessen nützlich oder zerstörerisch ist.

3.2.7. Kontrolle von Neurotoxinen

Hohe Konzentrationen exzitatorischer Neurotransmitter sind toxisch für Neuronen [57]. Es verdichtet sich die Annahme, daß das Absterben von Neuronen oder ihre Beschädigung nach akuten neurologischen Ereignissen zum größten Teil durch einen Anstieg der extrazellulären Konzentration von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat bedingt ist. Beim chronischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [129, 158], AIDS-assoziierte Demenz [147], Sulfat-Oxidase Insuffizienz, Amyotrophische Lateralsklerose und Morbus Huntington wird ebenfalls eine Toxizität durch Glutamat angenommen [57].

In Anwesenheit von hohen Glutamat-Konzentrationen führt die Entfernung der Astrozyten aus gemischten Kulturen zu einem raschen Absterben der Neuronen [203, 204, 228]. In vitro Studien zeigen, daß die Aminosäuretransmitter durch astrozytäre Aufnahmemechanismen aus dem Extrazellulärraum entfernt werden [86, 104, 110]. Astrozyten nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Metabolisierung der Transmitter Glutamat und gamma-Aminobuttersäure (GABA) ein. Diese Transmitter werden nach Ausschüttung in den synaptischen Spalt von Gliazellen aufgenommen und zu Glutamin metabolisiert [19, 230]. Das entstandene Glutamin wird an die Neuronen abgegeben und dient dort als Ausgangsstoff zur Produktion von GABA [20, 223]. Astrozyten enthalten

ebenso Glutamin-Synthetase, welches Glutamat in Glutamin umwandelt und bei der Entgiftung von Ammoniak im ZNS mitwirkt. Dieses Enzym wird unter pathologischen Bedingungen in aktivierten Astrozyten hochreguliert [47, 180]. Demzufolge ist es möglich, daß Astrozyten an der Entfernung von Neurotoxinen sowohl durch vermehrte Aufnahme, als auch durch erhöhte Verstoffwechselung beteiligt sind. Das in letzter Zeit durchgeführte Klonen des GABA-Transporters und der Amine: Noradrenalin, Serotonin und Dopamin könnte molekulare Werkzeuge herstellen, die beim Verständnis der Rolle von reaktiven Astrozyten in der Kontrolle von Neurotransmittern behilflich sind [222, 233].

Freie Radikale stellen eine andere Gruppe von Substanzen dar, die extrem toxisch für das Nervensystem sein können [98, 99]. Die Fähigkeit solche Substanzen zum Beispiel nach einer intrazerebralen Blutung zu eliminieren oder zu kontrollieren, könnte entscheidend für das ZNS sein [244]. Obwohl diese Eigenschaften nicht direkt an reaktiven Astrozyten untersucht wurden, gibt es dennoch Beweise, daß sie eine Rolle im antioxidativen System spielen. Die Pigmente Biliverdin und Bilirubin sind potente Antioxidantien [226]. Die Synthese wird durch die Enzyme HO-1 und HO-2 reguliert. HO-1 wird in Astrozytenkulturen exprimiert und in Gliazellen nach Hitzeschock im Gehirn von Ratten induziert [71, 83]. Apolipoprotein D, ebenfalls ein Enzym welches an der Produktion von Antioxidantien beteiligt ist, wird in Astrozyten im normalen ZNS exprimiert [38, 186]. Im peripheren Nervensystem steigt es nach Verletzung an [38]. Antioxidative Enzyme wie Superoxid Dismutase und Catalase scheinen in aktivierten Astrozyten bei der Alzheimer Erkrankung ebenfalls induziert zu werden [185].

Eine weitere wichtige Funktion ist der Erhalt der extrazellulären Ionenkonzentrationen. Mitte 1960 zeigten Kuffler, Nicholls und Orkand [131, 132, 183], daß Astrozyten hohe

Konzentrationen von Kalium enthalten. Newman und Karwoski [119, 176] konnte auf der Zelloberfläche von Müller Zellen, einer speziellen Form von Astrozyten, Kalium-Kanäle darstellen. Dies unterstützt die Annahme, daß Astrozyten extrazelluläres Kalium, welches bei neuronaler Aktivität entsteht, aus dem Extrazellulärraum entfernen und so für gleichbleibende Ionen-Konzentrationen sorgen.

4. GFAP Messungen in der Literatur

GFAP konnte bisher in wäßrigen Gewebsextrakten mittels Immundiffusion und Elektrophorese [234], Immunradiometrie [79, 153], Rocket Immunelektrophorese [68] und Doppel Antikörper Radioimmunoassays [184] nachgewiesen werden. Ein immunhistochemischer Nachweis in Geweben ist ebenfalls möglich [70].

Im Liquor gelang der direkte Nachweis von GFAP mittels Radioimmunoassay (RIA) [168, 179] und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [5, 205, 207]. Es konnten bei einigen neurologischen Erkrankungen wie zum Beispiel Schlaganfall, Schädel-Hirn-Trauma, intrakranielle Tumoren oder anderen Erkrankungen, die mit einer reaktiven Gliose einhergehen, erhöhte GFAP-Konzentrationen im Liquor nachgewiesen werden [101, 168].

Bei vielen Erkrankungen des Zentralnervensystems ist die Blut-Hirn-Schranke gestört und es kommt zu einem Übertritt von Bestandteilen aus dem Zentralnervensystem in die Blutbahn. Es kommt daraufhin zu einer Bildung von Autoantikörpern gegen diese Bestandteile. Insbesondere bei Erkrankungen mit chronischen Gefäßveränderungen konnten Autoantikörper gegen neurale Strukturen nachgewiesen werden [151]. So gelang ein indirekter Nachweis von GFAP in Körperflüssigkeiten, der jedoch keinen Rückschluß auf die tatsächliche GFAP-Konzentration zum Beispiel im Blut erlaubte. In

zahlreichen Artikeln wird der Nutzen von GFAP als biochemischen Marker in Liquor bei zentralnervösen Erkrankungen hervorgehoben [13, 32, 34, 69, 205, 207]. Albrechtsen [5] berichtete 1985 über Versuche mit einem Immunosandwichassay GFAP nicht nur im Liquor, sondern auch im Blut zu messen. Dies gelang jedoch aufgrund unklarer Interferenzen nicht. Weitere Arbeiten über Messungen von GFAP im Blut lagen zu diesem Zeitpunkt nicht vor.

Nach Fertigstellung dieser Arbeit erschienen weitere Arbeiten zur Messung von Neuronalen Markern im Blut. Von Missler [165] wurde gezeigt, daß die Anstiege der S-100 Spiegel im Blut bei herzchirurgischen Patienten nicht auf zentralnervöse Schädigungen allein zurückzuführen ist. In dieser Studie traten bei den Patienten keine meßbaren Erhöhungen von GFAP im Serum auf. Woertgen [246] konnte in einem Rattenmodell mit experimentellen Schädel-Hirn-Traumen einen signifikanten Anstieg von S-100 und GFAP in der Frühphase nach dem Trauma feststellen. Allerdings war eine zeitliche Korrelation von Serum-Spiegeln und Schwere des Traumas nicht möglich. Beems [21] konnte bei Patienten mit Hydrozephalus ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Liquor- und Blutspiegeln von neuronalen Proteinen finden. In einer Arbeit von Herrmann [102] scheint mittels eines eigenen GFAP-Assays sogar eine Differenzierung von Infarkttypen anhand von S-100 und GFAP-Spiegeln im Blut von Patienten nach akutem Schlaganfall möglich zu sein. Hier lagen die Referenzwerte des gesunden Patientenkollektivs bei 0,3mg/l. Die untere Nachweisgrenze wird nicht erwähnt. Bei lakunären Infarkten wurden GFAP-Konzentrationen bis 0,5mg/l, bei Infarkten im anterioren Stromgebiet bis 0,7mg/l und bei Infarkten im kompletten anterioren Stromgebiet bis 8,5mg/l gemessen. GFAP scheint laut dieser Arbeit ein sensitiverer Marker bei lakunären und kleinen Infarkten im anterioren Stromgebiet zu sein, als S-100. Chekhonin [51] konnte mittels Messungen von GFAP-Spiegeln im Blut den Erfolg

von Transplantationen von embryonalem Nervengewebe in Ratten mit Hemiparkinson überwachen. Nach erfolgreicher Transplantation fielen die GFAP-Spiegel im Blut im Verlauf ab, während sie bei Abstoßungsreaktionen erhöht blieben. 2002 wurde von Van Geel [235] ebenfalls ein Assay zur Messung von GFAP im Blut vorgestellt. Bei diesem ELISA lag die untere Nachweisgrenze bei 0,15 µg/l. Der Referenzwert des Referenzkollektivs ist in diesem Assay mit 0,49 µg/l. Bei den untersuchten 32 Schlaganfallpatienten korrelierten die GFAP-Spiegel und die S-100-Spiegel signifikant miteinander. Bei einem beispielhaft vorgestellten Patienten stieg der GFAP-Spiegel auf über 12 µg/l an.

5. Das S-100 Protein

S-100 bezeichnet eine sehr heterogene Familie von Proteinen, deren Name vom Erstbeschreiber Moore [167] stammt. Man unterscheidet das S-100 A1 und das S-100B. S100A1 wurde bisher in Gehirn, Aorta, Blase, Fettgewebe, Kolon, Herz, Niere, Dünndarm, Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Hoden, Uterus und in der Haut nachgewiesen. Das S-100B konnte bisher in Gehirn, Aorta, Blase, Fettgewebe, Kolon, Dünndarm, Pankreas, Skelettmuskel, Hoden, Fettgewebe, Haut und Nerven nachgewiesen werden. Die physiologische Funktion dieser Proteine ist bis heute ungeklärt [255].

5.1 S-100 Messungen in der Literatur

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Untersuchungen über Erhöhung der S-100 Konzentrationen im Liquor bei Schädigungen des Zentralnervensystems publiziert [121, 122, 163, 178, 220]. Persson [189] berichtete 1987 erstmals über S-100 Protein Messungen im Blut und konnte erhöhte Konzentrationen bei Patienten mit

Schlaganfall, Subarachnoidalblutungen, intrazerebralen Blutungen, sowie Schädel-Hirn-Traumen nachweisen. Ingebrigsten [114, 115] und Waterloo [240] und Woertgen [245] beschrieben erstmals einen Zusammenhang zwischen leichten und schweren Schädel-Hirn-Traumen und der S-100 Konzentration im Serum.

6. Material und Methode

6.1. Material und Methode (GFAP)

6.1.1. Meßmethode für GFAP

Die hier beschriebene Meßmethode ist eine immunofluorometrischer Sandwich-Festphasenassay mit Flachboden-Mikrotiterplatte von Nunc[®] (Maxisorp F 96[®]) als Festphase. Zur Messung wird die zeitverzögerte Immunfluoreszenz (DELFI[®] =Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immuno Assay) der Firma Wallac, Turku, Finnland verwendet. Um den Verbrauch des sehr kostspieligen DELFI[®] Labelling Reagent[®] (Pharmacia, Uppsala Schweden) zu reduzieren, wird der zweite Antikörper biotinyliert und als Signalträger mit Europium markiertes Streptavidin (Biomol,Hamburg, BRD) verwendet. So wird ausschließlich spezifisch immunreagibles Protein mit Europium markiert.

Zunächst werden die Mikrotiterplatten mit einem polyklonalen antigenaffinitätsgereinigten Ziegenantikörper (Medac) gegen Maus Immunglobulin (Ig-G) Antikörper von Medac beschichtet. Auf diese Weise konnten mehr anti-GFAP-Antikörper als feste Phase gebunden werden. Dieser polyklonale anti-Maus Antikörper bindet den monoklonalen anti-GFAP Antikörper von Sigma (Klon G-A-5). Nach Antigen (GFAP) Bindung wird ein polyklonaler Kaninchenantikörper (Dako) als Flüssigphasenantikörper eingesetzt, der zuvor biotinyliert wurde. Es folgt die

Inkubation mit Streptavidin markiertem Europium. Zuletzt wird die Platte mit einer sogenannten Enhancementlösung inkubiert. Die Messung und Auswertung erfolgt auf dem DELFIA® 1234 Fluorometer.

6.1.2. Plattenbeschichtung

Für jeden Assay wird eine Mikrotiter-Platte mit 400 ng/well eines affinitätsgereinigten Ziegen anti-Maus Immunglobulin Antikörpers in 200 µl/well Karbonatpuffer 0,05 mol/l pH 9,6 beschichtet. Die Platte wird mit Mikrotiterplattenversiegler verschlossen und bei 4°C inkubiert. Die minimale Beschichtungszeit beträgt bei Zimmertemperatur 18 Stunden.

Anschließend wird die Platte zweimal im Plattenwascher mit Waschpuffer gewaschen (Plattenwascher von Wallac) und mit 600 ng/well monoklonalem Maus anti-GFAP Antikörper in 200 µl/well Assaypuffer beschichtet. Die Platte wird wieder verschlossen, über Nacht bei 4°C inkubiert und dann so bei 4°C gelagert.

6.1.3. Biotinylierung des 2. Antikörpers

Es wurde ca. 10 mg Antikörper nach Fällung mit 20-prozentigem Polyethylenglycol (PEG) 6000 (Merck, Darmstadt, BRD) in Karbonatpuffer 0,05 Mol/l, pH 9,6 (Merck) resolubilisiert, mit 1,5 mg Biotinamidocaproylester (Sigma) gelöst in 50µl wasserfreiem Dimethylformid über Nacht bei 4°C inkubiert. Das nicht gebundene Biotin wurde anschließend mittels Gelfiltration über eine Sephadex G100®-Säule (Pharmacia), eluiert mit TRIS/HCl 0,05 mol/l (Merck), pH 7,5 getrennt. Die den Antikörper enthaltende Fraktion, bestimmt mittels photometrischer Absorption bei 280nm, wurde gepoolt und zu je 200µl fraktioniert bei -80°C gelagert.

6.1.4. Markierung des Streptavidin mit Europium

20 mg Streptavidin (Biomol, Hamburg, BRD) wurden entsprechend der Herstellervorgaben mit dem Europium Labelling-Reagent[®] (Pharmacia) markiert. Der nicht gebundene Europiumkomplex wurde in gleicher Weise wie bei der Trennung der biotinylierten Antikörper über Sephadex G100[®] mit TRIS/HCl 0,05 mol/l, pH 7,5 getrennt, die Protein-enhaltende Fraktion gesammelt und zu je 200µl eingefroren. Der Markierungserfolg wurde durch Messung von 10µl einer 1:10000-Verdünnung im Fluorometer kontrolliert.

6.1.5. Herstellung des TRIS/HCl/NaCl-Puffer

6 g/l TRIS, 9 g/l NaCl, 1 g/l NaN₃, 0,1 ml Tween 20, 80 mg/l DTPA (Diethylen-triaminpentaacetat) (Sigma), 10 g/l bovines Serumalbumin (Sigma) und 0,5 g/l bovines γ -Globulin (Sigma) wurden in Aqua bidest gelöst.

6.1.6. Herstellung des Waschpuffers

Zunächst wurde ein Konzentrat des Waschpuffers hergestellt, aus dem durch 1:50 Verdünnung die fertige Waschlösung hergestellt wurde.

Auf einem Liter Aqua bidest wurden 15g TRIS (Merck), 225 g NaCl (Merck) und 50 ml Tween 20 (Sigma) gegeben und anschließend mit HCl auf einen pH von 7,5 eingestellt.

6.1.7. Herstellung der Enhancement-Lösung

Die Enhancementlösung wurde in Abwandlung der beschriebenen Methode hergestellt [126]. Auf einen Liter Aqua bidest wurden 6,25 ml konzentrierte Essigsäure (Merck), 38 mg Tris-n-octylphosphinoxid (Merck), zusammen mit 222 mg/Thenoyltrifluoraceton (Sigma) in 2 ml Ethanol 100 Prozent (Merck) gelöst, 1,3 g Kaliumphthalat (Sigma) und 2

ml Triton X-100 (Sigma) gegeben. Die Lösung war unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur über mehr als ein Jahr stabil.

6.1.8. Standard

Für die Kalibrierung und internen Kontrollen wird gereinigtes GFAP von Progen in Humanplasma-Pool ohne GFAP-Immunreaktivität verwendet.

6.1.9. Herstellung der Kalibrierungslösungen

1 mg GFAP wird in 1ml NaCl gelöst und mit Humanserum auf eine Konzentration von 12,5 µg/l verdünnt. Die weiteren Standards werden durch weitere Verdünnung von Teilen der Ursprungslösung hergestellt. Die Konzentrationen der Kalibrierungslösungen betragen 12,5; 6,25; 1,25; 0,25; 0,05 und 0,01 µg/l.

6.1.10. Assaybeschreibung für das GFAP

Die mit monoklonalem Maus anti-GFAP Antikörper beschichtete Platte wird zweimal mit Waschpuffer gewaschen und es werden 200µl/well Standardlösung, Kontrolle und Proben aufgetragen. Außerdem werden 100µl/well Assay-Puffer hinzugefügt und die Platte 60 min lang inkubiert.

Die Platte wird zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Zu Reduktion der unspezifischen Bindungen werden zu dem markierten Antikörper aus dem Säuleneluat in Assaypuffer Neugeborenen-Kälberserum (NCS) von GIBCO in 50% Vol/Vol hinzugefügt. Davon werden 200 µl/well auf die Platte aufgetragen. Es folgt eine 60 minütige Inkubation.

Die Platte wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen und es werden 200µl/well des Streptavidin-Europiums in Assaypuffer (25µg/l) hinzugefügt und 30 min inkubiert.

Es folgt nochmals eine dreimalige Waschung mit Waschpuffer und es werden 200 µl/well der Enhancement-Lösung hinzugefügt und für 20 min inkubiert.

Die Messung erfolgt wie beschrieben auf dem DELFIA®1234 Fluorometer.

Alle Messungen finden als Doppelmessungen bei Raumtemperatur statt. Die Inkubationen erfolgten auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Heidolph, Kehlheim, BRD) bei 200/ min.

6.2. Material und Methode für das S-100 Protein

6.2.1. Meßmethode für das S-100 Protein

Die Messungen der S-100 Konzentration im Blut wurden wie von Missler [166] beschrieben durchgeführt. Als Referenzwerte für diese Meßmethode wurden von Wiesmann [243] S-100 Plasma Konzentrationen von $0,059 \pm 0,038 \mu\text{g/l}$ in einem Kollektiv von 200 gesunden Personen ermittelt.

6.3. Probenasservation und Lagerung

Die Asservation des entnommenen Blutes war bei allen Patienten gleich. Das Blut wurde innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme zentrifugiert, zu je 500µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

6.4. Kollektive

6.4.1. Referenzkollektiv

Als Referenzgruppe für die GFAP-Messung wurden 70 Blutproben von 20 bis 65 jährigen gesunden Blutspendern (35 männliche und 35 weibliche, Mittleres Alter

38,6±13,2, Jahre MW±s) entnommen. Bei diesen war keine vorangegangene neurologische Erkrankung oder eine andere schwere Erkrankung bekannt. Die Probanden nahmen keine Medikamente ein. Die körperliche Untersuchung und Laborparameter dieser Probanden waren ohne Auffälligkeiten.

6.4.2. Patientenkollektiv und Blutentnahmen

Die Blutproben stammen von 25 Patienten, die innerhalb von 24 Stunden auf die Intensivstation der Klinik für Neurochirurgie der Medizinischen Universität zu Lübeck wegen eines schweren Schädel-Hirn-Traumas (Glasgow-Coma-Scale =6) aufgenommen wurden. Davon waren 19 männlich und 6 weiblich. Das Alter lag zwischen 16 und 72 Jahren (38,6 ± 19,0 Jahre MW±s). Da die Patienten zu diesem Zeitpunkt der Aufnahme nicht einwilligungsfähig waren, wurde das Einverständnis der Angehörigen eingeholt. Jedem Patienten wurden insgesamt 3 Blutproben jeweils als Heparinplasma (für die S-100 Messung) und als Serum (für die GFAP Messung) entnommen. Die erste Abnahme erfolgte unmittelbar nach Aufnahme, die zweite 24 Stunden nach dem Trauma und die dritte nach 48 Stunden.

6.5. Statistische Methoden

Die statistische Signifikanz von Gruppenunterschieden wird mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5 Prozent wird als signifikant eingestuft ($p < 0,05$). Korrelationen werden mit der Spearman Rank-Methode errechnet. Zahlenangaben erfolgen als Mittelwert ± Standardabweichung.

7. Ergebnisse

7.1. Assaycharakteristik für das GFAP

7.1.1. Standardkurve

Die GFAP Standardkurve reichte von 0,01 µg/l bis 12,5 µg/l. Eine typische Kurve in doppelt logarithmischer Darstellung findet sich in folgender Abbildung:

Standardkurve

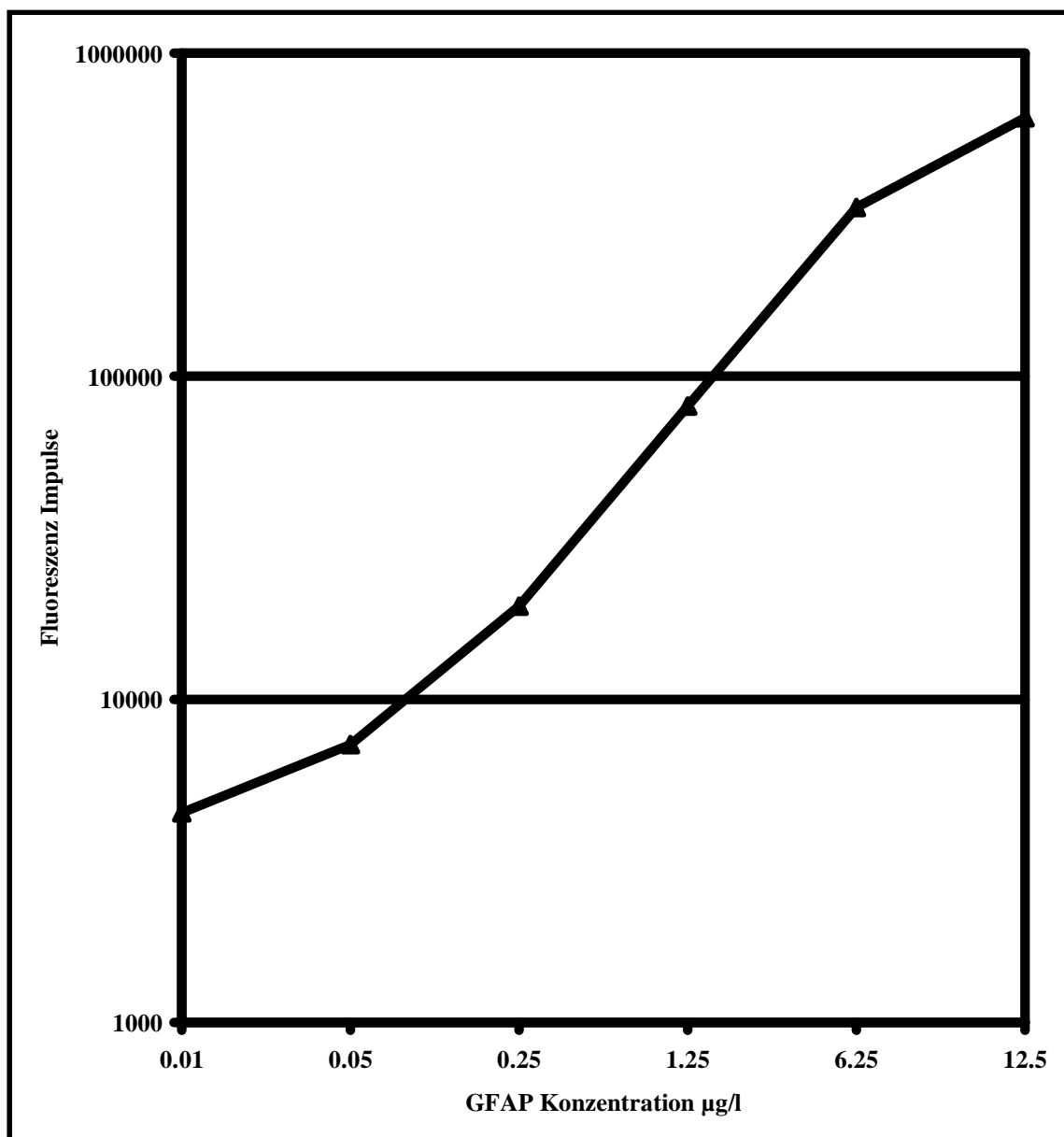


Abbildung 1: GFAP-Standardkurve

7.1.2. Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze der Methode wurde mittels einer 33-fachen Messung des Verdünnungsmediums ermittelt. Zum Mittelwert (MW) der hierbei gemessenen Impulsraten wurde die dreifache Standardabweichung (s) addiert. Die bei MW+3s an der Standardkurve ermittelte Konzentration ist die untere Nachweisgrenze. Sie liegt bei $<0,01 \mu\text{g/l GFAP}$ (0+3s, n=33).

7.1.3. Spezifität der Meßmethode

Da andere Meßmethoden für das GFAP nicht verfügbar waren, wurde die Spezifität der Methode für GFAP aus der Wiederfindungsrate und dem Ergebnis der Linearitätsuntersuchung geschlossen.

7.1.4. Präzisionsprofile

Die Intra-Assay Varianz liegt bei 4,7% bei einer mittleren Konzentration von $0,2 \mu\text{g/l}$ (n=33), 4,2% bei einer mittleren Konzentration von $2,0 \mu\text{g/l}$ (n=24) und bei 3,5% bei einer mittleren Konzentration von $10 \mu\text{g/l}$ (n=32). Die Inter-Assay Varianz für 43 an 15 Tagen durchgeführten Assays lag bei 8,8% bei einer GFAP-Konzentration von $0,74 \mu\text{g/l}$ und 10,4% bei einer Konzentration von $7,7 \mu\text{g/l}$.

Intra-Assay Varianz

Messung	erwartete Konzentration 0,20 µl/l Messwerte (µg/l)	erwartete Konzentration 1,96 µg/l Messwerte (µg/l)	erwartete Konzentration 9,58 µg/l Messwerte (µg/l)
1	0,217	2,100	9,500
2	0,200	2,000	9,100
3	0,204	1,800	9,000
4	0,203	2,000	9,500
5	0,221	2,000	9,700
6	0,218	2,000	9,900
7	0,215	2,000	9,900
8	0,205	1,900	9,400
9	0,200	1,900	9,200
10	0,200	1,900	9,500
11	0,206	2,000	9,500
12	0,201	2,000	10,000
13	0,203	2,000	9,700
14	0,193	1,900	9,200
15	0,189	2,000	9,200
16	0,191	2,000	9,500
17	0,199	2,000	9,600
18	0,202	2,100	10,200
19	0,204	2,000	9,700
20	0,195	2,000	9,500
21	0,190	1,800	9,200
22	0,194	1,800	8,800
23	0,203	1,900	9,700
24	0,198	1,900	9,900
25	0,209		9,500
26	0,192		9,500
27	0,195		9,700
28	0,190		9,700
29	0,192		10,100
30	0,194		10,100
31	0,214		9,900
32	0,187		9,900
33	0,183		

Tabelle 1: Dreiunddreißig Messungen von drei Proben mit bekannten GFAP-Konzentrationen in Folge zur Ermittlung der Intra-Assay Varianz.

7.1.5. Linearität des Assays

Die Linearität des Assays wurde mit einer Reihenverdünnung von drei Humanseren nach Zugabe von GFAP bestätigt.

Linearität des Assays

Verdünnungsfaktor	Probe 1 µg/l	Probe 2 µg/l	Probe 3 µg/l
1	8,080	3,630	8,240
2	4,050	1,640	3,950
4	1,880	0,790	1,910
8	0,880	0,340	0,920
16	0,370	0,140	0,390
32	0,160	0,060	0,170

Tabelle 2: Reihenverdünnung von drei Humanserumproben nach Zugabe GFAP.

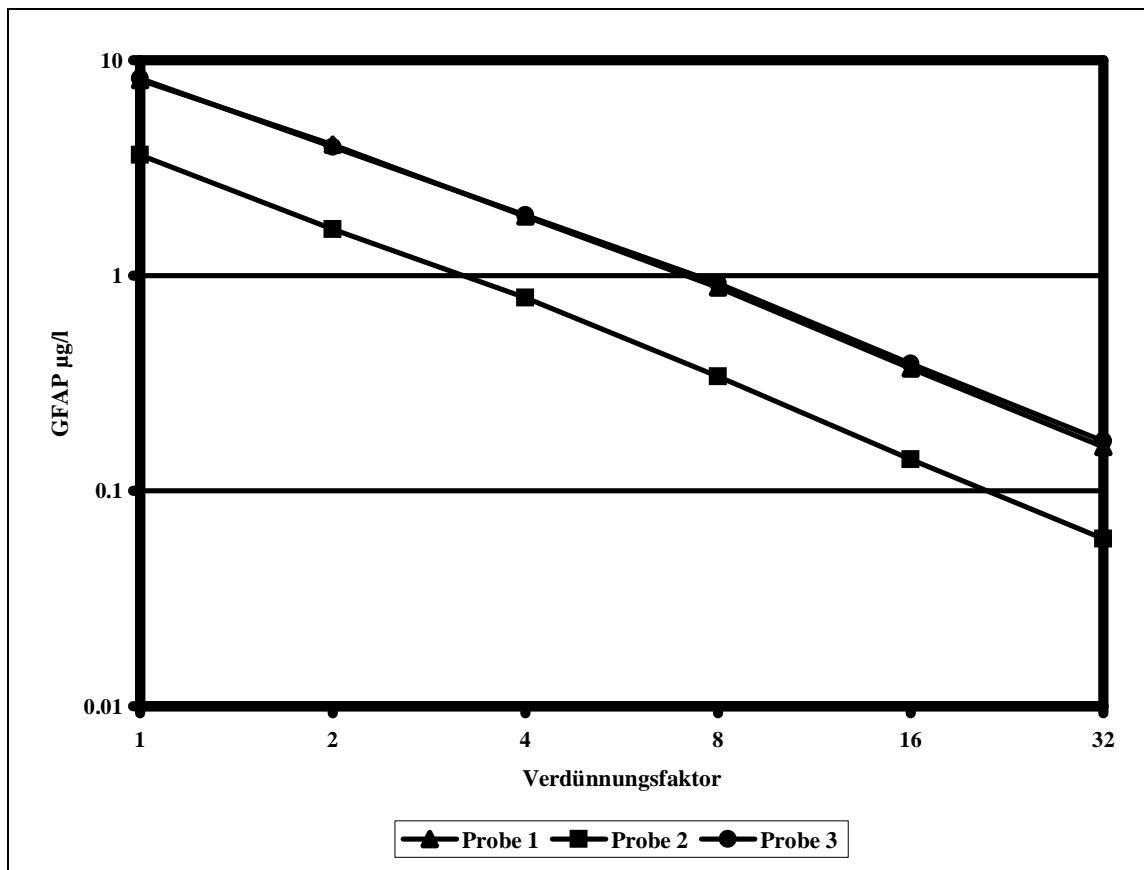


Abbildung 2: Reihenverdünnung von drei Humanserumproben nach Zugabe GFAP

7.1.6. Wiederfindung

Die analytische Wiederfindung von GFAP wurde durch die Zugabe von zwei bekannten Mengen von gereinigtem GFAP zu 10 Patientenproben getestet. Die Wiederfindung von GFAP bei 10 Proben war 68%-103% (Mittelwert 88%, n=10) für eine erwartete Konzentration von 0,475 µg/l und 61%-95% (Mittelwert 77%, n=10) für eine erwartete Konzentration von 4,75 µg/l.

Analytische Wiederfindung des GFAP Assay nach Zugabe von GFAP

Proben	Leer-Messung	Erwartete Konzentration: 0,475 µg/l	Wiederfindung in %	erwartete Konzentration: 4,75 µg/l	Wiederfindung in %
1	0,005	0,437	92	4,370	92
2	0,013	0,486	102	4,526	95
3	0,015	0,425	89	3,390	71
4	0,014	0,490	103	4,429	93
5	0,003	0,411	87	3,650	77
6	0,018	0,455	96	3,426	72
7	0,008	0,322	68	2,884	61
8	0,009	0,435	92	3,535	74
9	0,004	0,361	76	3,007	63
10	0,003	0,400	84	3,259	69

Tabelle 3: Analytische Wiederfindung nach Zugabe von zwei bekannten Konzentrationen zu zehn Humansenen.

Zuvor gemessene Patientenproben mit GFAP-Konzentrationen von 0,04 µg/l bis 0,12 µg/l 1:1 (V:V) wurden gemischt. Die Meßwerte lagen in einem Bereich von 91%-111% (Mittelwert 100, n=21) um die rechnerisch erwarteten Werte.

Analytische Wiederfindung des GFAP Assay

Proben	Gemessene Konzentration µg/l	Mischung der Proben 1:1	Gemessene Konzentration µg/l	Erwartete Konzentration µg/l	Gemessene Konzentration %
3	0,057	3+4	0,071	0,069	103
4	0,081	3+5	0,060	0,063	96
5	0,068	4+5	0,080	0,075	107
6	0,067	4+6	0,068	0,074	92
7	0,049	6+7	0,053	0,058	91
8	0,040	6+8	0,050	0,054	93
9	0,074	7+8	0,047	0,045	106
10	0,042	7+9	0,057	0,062	93
11	0,090	8+9	0,059	0,057	104
12	0,052	8+10	0,042	0,041	102
13	0,097	9+10	0,057	0,058	98
14	0,102	9+11	0,081	0,082	99
15	0,066	10+11	0,067	0,066	102
16	0,075	10+12	0,052	0,047	111
17	0,078	11+12	0,077	0,071	108
18	0,116	11+13	0,092	0,094	98
		13+14	0,103	0,100	104
		13+15	0,077	0,082	94
		14+15	0,078	0,084	93
		14+16	0,084	0,089	95
		17+18	0,100	0,097	103

Tabelle 4: Analytische Wiederfindung nach 1:1 (V:V) Mischung von zuvor gemessenen Proben.

7.1.7. Stabilität von GFAP im Serum

Um die Stabilität von GFAP im Blut über einen bestimmten Zeitraum zu untersuchen, wurden 5 Proben eine bestimmte Menge GFAP zugesetzt, sofort und nach 1, 2 und 3 Tagen gemessen. Die Proben wurden über diesen Zeitraum bei 4°C aufbewahrt. Die Differenzen zwischen den gemessenen GFAP-Konzentrationen erreichte keine statistische Signifikanz.

Lagerungsstabilität von GFAP im Serum

Aufbewahrung	GFAP-Konzentration µg/l								
Zeitraum	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
0. Tag	0,002	0,760	6,595	0,003	0,731	6,743	0,002	0,678	6,429
1. Tag	0,006	0,679	6,960	0,006	0,682	6,449	0,005	0,705	6,676
2. Tag	0,005	0,620	5,539	0,006	0,678	5,901	0,005	0,754	5,207
3. Tag	0,004	0,593	5,155	0,003	0,643	4,915	0,003	0,637	4,522
	Probe 4			Probe 5					
0. Tag	0,002	0,639	6,099	0,002	0,648	6,284			
1. Tag	0,005	0,680	6,730	0,006	0,615	5,412			
2. Tag	0,004	0,698	5,717	0,005	0,562	4,654			
3. Tag	0,002	0,679	5,715	0,003	0,581	4,419			

Tabelle 5: Fünfmalige Messung von GFAP in fünf, über drei Tage bei 4°C gelagerten Humanserumproben, nach Zugabe von GFAP.

Viermaliges Einfrieren und Auftauen der Proben hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die gemessenen GFAP-Konzentrationen.

Stabilität von GFAP im Serum bei mehrmaligen Einfrieren und Auftauen

Wiederholungen Einfrieren/Auftauen	GFAP Konzentration in µg/l								
	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
0	0,003	0,818	7,524	0,728	0,003	6,290	0,002	0,681	6,206
1	0,007	0,777	7,687	0,648	0,005	6,460	0,005	0,626	5,982
2	0,001	0,710	6,766	0,640	0,041	5,780	0,003	0,622	5,949
3	0,003	0,814	8,086	0,750	0,012	6,538	0,003	0,733	7,048
4	0,002	0,900	8,284	0,807	0,007	6,647	0,004	0,798	6,619
	Probe 4			Probe 5					
0	0,002	0,618	5,692	0,003	0,631	5,623			
1	0,021	0,629	5,744	0,006	0,707	6,441			
2	0,004	0,958	5,240	0,003	0,631	6,440			
3	0,003	0,692	6,304	0,004	0,664	6,017			
4	0,003	0,715	6,092	0,002	0,711	6,315			

Tabelle 6: Fünfmalige Messungen von fünf Humanserumproben nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen nach Zugabe von GFAP.

7.1.8. Verhalten des Assays bei hohen GFAP-Konzentrationen

Es konnte kein Hochdosiseffekt (high dose hook effect) bei GFAP-Konzentrationen bis 500 µg/l festgestellt werden. Die Anzahl der Impulse beträgt für die Konzentration 12,5 µg/l: 1530235 Impulse und für eine Konzentration von 500 µg/l: 4231950 Impulse.

Verhalten des Assays bei hohen GFAP-Konzentrationen

high dose hook			
GFAP µg/l	12,5	50	500
Impulsrate	1530235	3256430	4231950

Tabelle 7: Messung von 3 Proben nach Zugabe von GFAP

7.1.9. Referenzwert von GFAP im Blut

Bei 9 von 70 Blutproben waren GFAP-Konzentrationen nachweisbar, die im Bereich der Standardkurve der Methode lagen (Bereich 0,002-0,070 µg/l GFAP, Mittelwert

0,005 µg/l, 97,5 Perzentile 0.033µg/l). Ein Referenzbereich im Blut konnte aufgrund der oben genannten Daten nicht definiert werden.

Bestimmung der GFAP-Konzentration in gesunden Personen

Probe	GFAP-Konzentration < Nachweisgrenze	GFAP-Konzentration > Nachweisgrenze	Probe	GFAP-Konzentration < Nachweisgrenze	GFAP-Konzentration > Nachweisgrenze
	µg/l	µg/l			
1	0,005		36	0,003	
2	0,004		37	0,003	
3	0,004		38	0,004	
4	0,004		39	0,004	
5	0,005		40	0,003	
6	0,006		41	0,003	
7		0,049	42	0,002	
8		0,014	43		0,012
9		0,012	44	0,003	
10	0,004		45	0,003	
11	0,005		46	0,003	
12	0,005		47	0,002	
13	0,007		48	0,003	
14	0,006		49	0,002	
15	0,005		50	0,003	
16	0,004		51	0,003	
17	0,005		52	0,004	
18	0,005		53	0,005	
19	0,006		54	0,003	
20	0,005		55	0,002	
21	0,008		56	0,002	
22	0,004		57		0,070
23	0,004		58	0,003	
24	0,005		59	0,002	
25	0,008		60	0,002	
26	0,005		61	0,002	
27	0,003		62	0,002	
28	0,004		63	0,003	
29	0,005		64	0,002	
30		0,012	65	0,002	
31		0,011	66	0,003	
32	0,005		67		0,028
33		0,010	68	0,007	
34	0,003		69	0,002	
35	0,003		70	0,004	

Tabelle 8: Messung der GFAP-Konzentration in siebzig Humanserumproben von gesunden Blutspendern.

7.2. Klinische Studie

Im folgenden werden die Ergebnisse der Messungen von GFAP und S-100 im Blut von Patienten mit akutem schweren Schädel-Hirn-Trauma vorgestellt. Beide wurden mit zerfallsunterstützten Lanthanide-Fluoreszenz Immunoassays (DELFI A) gemessen.

Von den 25 Patienten wurden 6 innerhalb der ersten 3 Stunden nach dem Trauma aufgenommen, 9 zwischen 4-6 Stunden und 10 innerhalb der 7.-16. Stunde. Bei allen 25 Patienten konnte unmittelbar nach Aufnahme sowie nach 24 Stunden Blut entnommen werden. Nach 48 Stunden war dies nur noch bei 16 Patienten möglich, da die anderen 9 inzwischen verstorben oder entlassen waren. GFAP-Werte oberhalb von 0,033 µg/l wurden als erhöht eingestuft. Dies entspricht der 97,5 Perzentile der Werte des Referenzkollektivs.

Es fanden sich in 12 der 25 Blutproben zum Aufnahmezeitpunkt; jedoch nur in einer der 25 nach 24 Stunden und einer der 16 nach 48 Stunden entnommenen Blutproben erhöhte GFAP-Werte. Die mittleren GFAP-Werte lagen bei $0,10 \pm 0,18$ mg/l zum Aufnahmezeitpunkt, bei $0,012 \pm 0,026$ µg/l nach 24 Stunden und bei $0,017 \pm 0,052$ µg/l nach 48 Stunden nach dem Trauma. Je früher nach dem Trauma die Blutentnahmen erfolgten, desto höher war die Wahrscheinlichkeit erhöhte GFAP-Werte zu finden. So fanden sich erhöhte GFAP-Werte bei allen 6 Proben, die innerhalb der ersten 3 Stunden, bei 5 von 9 Proben die zwischen 4-6 Stunden und nur in einer von 10 Proben, die zwischen 7-16 Stunden nach dem Trauma entnommen worden waren.

Erhöhte S-100-Werte fanden sich bei 2 von 25 Proben zum Aufnahmezeitpunkt, bei 23 von 25 Proben nach 24 Stunden und bei 10 von 16 Proben nach 48 Stunden nach dem Trauma. Die mittleren S-100-Konzentrationen betrugen $1,50 \pm 1,65$ µg/l zum Zeitpunkt der Aufnahme, $1,24 \pm 1,92$ µg/l nach 24 Stunden und $1,49 \pm 2,15$ µg/l nach 48 Stunden

nach dem Trauma. Die GFAP- und S-100-Blutkonzentrationen der 15 Patienten, die innerhalb von 6 Stunden zur Aufnahme gekommen waren, korrelierten signifikant miteinander: $r^2 = 0,781$; $y = 8,03x + 0,67$; $p < 0,05$.

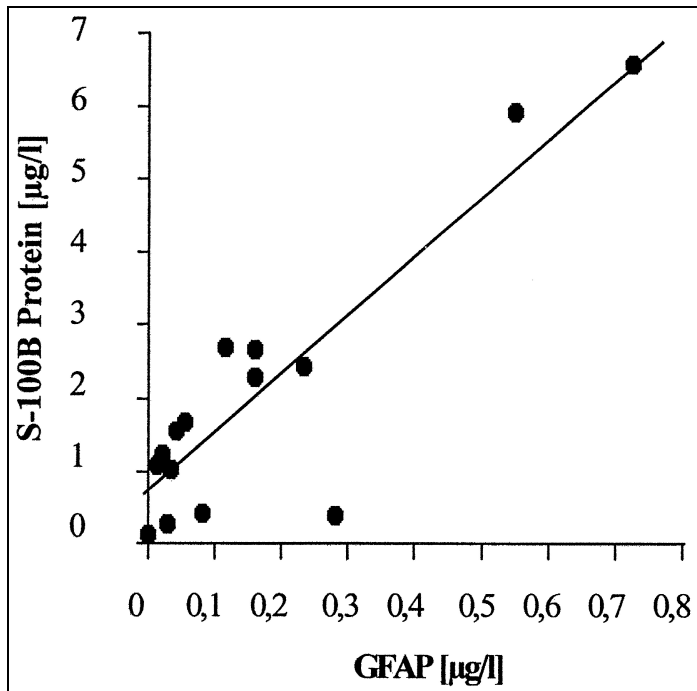


Abbildung 3: Korrelation der S-100- zu den GFAP Werten im Blut von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma.

8. Diskussion

8.1 Meßmethode

Die im folgenden diskutierte Meßmethode basiert auf der Bindung von GFAP an einen Festphasenantikörper und die anschließende Bindung eines Biotin-markierten Nachweisantikörpers. Die Bindung wird durch Europium-markiertes Streptavidin meßbar gemacht. Die Meßmethode soll innerhalb eines Arbeitstages (Verzicht auf Inkubationen über Nacht) durchgeführt werden können, stabil und zuverlässig sein und von jeder Labor-MTA oder eingearbeiteten Hilfskräften durchgeführt werden können.

Da das S-100 Protein nicht nur in Zellen des Zentralnervensystems vorkommt, wurde ein Parameter gesucht, der spezifisch für das Zentralnervensystem ist. Nach dem Stand der Literatur entsprach das GFAP dieser Anforderung, da es ausschließlich in Astrozyten vorkommt. Bisher konnte GFAP bereits im Liquor bei neurologisch erkrankten Patienten nachgewiesen werden [5, 13, 32-35, 69, 75, 169, 179, 205-207]. Bei der Bestimmung des GFAP im Liquor gilt jedoch, daß bei Patienten mit erhöhtem intrakraniellen Druck die Entnahme von Liquor problematisch, oft sogar gefährlich, ist. Daher sollte in dieser Arbeit nicht die Reihe der Arbeiten über Konzentrationsänderungen im Liquor fortgesetzt werden, sondern der Versuch unternommen werden, GFAP im Blut zu messen. Dies ist in der Literatur nur ein einziges Mal in einer russischen Arbeit beschrieben, die jedoch nur in Russisch erschienen ist [12]. Eine Bewertung dieser Arbeit ist mir nicht möglich. In einem Artikel von Herrmann [102], der nach Abschluß dieser Arbeit erschien, wurde mittels eines eigenen GFAP-Assays ein Zusammenhang zwischen Serumkonzentrationen und einzelnen Infarkttypen hergestellt. Die Beschränkung auf Infarkte im anterioren Stromgebiet und die mit 25 Patienten kleine Patientengruppe schränken die allgemeine Aussagekraft dieser Studie jedoch ein. Es wird sowohl die untere Nachweisgrenze, als auch der Nachweis von GFAP-Konzentrationen oberhalb dieser Nachweisgrenze im Referenzkollektiv nicht erwähnt. Solch spezifische Interpretationen erscheinen angesichts der minimalen Anstiege der GFAP-Konzentrationen in dieser Studie kritisch. Der von van Geel [235] vorgestellte GFAP-Assay konnte in 22 von 72 gesunden Personen GFAP nachweisen. Außerdem ergab sich mit 0,49mg/l ein deutlich höherer Referenzwert als im hier vorgestellten Assay. Bei dem beispielhaft vorgestellten Patienten lag im Verlauf ein maximal 26-facher GFAP-Spiegel vor. Dies entspricht in etwa den Anstiegen bei den in dieser Arbeit vorgestellten Schädel-Hirn-Trauma

Patienten, bei denen bis zu 21-fache Werte des Referenzwertes gemessen wurden. Van Geel kommt in seiner Studie ebenfalls zu dem Schluß, daß die Messung von GFAP ein vielversprechender Marker für einen astrozytären Schaden ist. Im Vergleich sind die Leistungsdaten des von van Geels vorgestellten Assays dem hier vorgestellten Assay sehr ähnlich. Es bleibt also das Problem der zu hohen unteren Nachweisgrenze und der minimalen Anstiege der GFAP-Spiegel bei pathologischen Ereignissen ungelöst.

Das GFAP stammt ausschließlich aus dem Zentralnervensystem, daher können GFAP-Moleküle im Blut nur aus dem Zentralnervensystem stammen. Das Molekulargewicht ist, verglichen mit zum Beispiel S-100, mit 52 kDa doppelt so hoch und es muß eine ausgeprägte Schrankenstörung vorliegen, damit es in den Blutkreislauf übertreten kann. Aus der Literatur ist bekannt, daß GFAP von kalziumabhängigen Proteasen gespalten wird [65]. Ob diese Prozesse als mögliche Störfaktoren wirklich zum Tragen kommen ist jedoch zweifelhaft, da von Aurell [14] und in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß GFAP im Liquor und Serum ohne Zusatz von Kalziumchelatoren über mindestens 2 Tage stabil bleibt. Außerdem konnte von Dahl [61] nachgewiesen werden, daß die Proteolyse keine Abschwächung der Antigenität zur Folge hat. Aus diesen Überlegungen heraus stimmen die Ergebnisse, daß nur bei 10 von 70 Gesunden erhöhte GFAP-Werte zu messen waren gut mit den theoretischen Überlegungen überein. Die untere Nachweisgrenze lag im Vergleich 50% unterhalb des S-100 Assays. Dies konnte erreicht werden, in dem der Festphasenantikörper nicht direkt an die Mikrotiterplatte gebunden wurde, sondern zunächst ein affinitätsgereinigter Antikörper gegen Maus-Immunglobuline adsorptiv an die Platte gebunden wurde. An diese koppelten sich dann in einem zweiten Schritt die gegen das GFAP gerichteten IgG Moleküle aus dem Mausaszites. Dieses Verfahren wurde gewählt, da die als Aszites gelieferte Antikörperlösung auch einen großen Anteil unspezifischer Proteine enthielt. Es

existieren zwar zuverlässige und qualitativ ausreichende Verfahren die Immunglobuline zu reinigen, diese sind jedoch mit dem Nachteil einer sehr geringen Ausbeute von Immunglobulin behaftet und wären deshalb sehr teuer gewesen.

Trotz dieser Probleme hat der GFAP-Assay sich als präzise und zuverlässig erwiesen. Mit dieser Methode konnten ca. 1000 Proben von Patienten mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen gemessen werden. Die höchsten Serumkonzentrationen des GFAP wiesen Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma auf, die ebenfalls zum Teil exzessiv erhöhte S-100 Spiegel im Blut hatten. Die GFAP Konzentrationen lagen etwa um den Faktor 10 niedriger, als die des S-100. Dennoch wurde eine signifikante Korrelation zwischen S-100 und GFAP im Blut nachgewiesen ($r^2 = 0,781$; $y=8,03x + 0,67$; $p<0,05$). Dies ist der erste Nachweis von GFAP im Blut von Patienten, der eine Aussage über den möglichen diagnostischen Nutzen zulässt. Allerdings müsste die untere Nachweisgrenze dieser Methode noch einmal deutlich gesenkt werden, um auch bei anderen neurologischen Erkrankungen diagnostisch eingesetzt werden zu können.

8.2. Klinische Studie

Jährlich erleiden in der Bundesrepublik Deutschland ca. 150.000 bis 200.000 Menschen ein Schädel-Hirn-Trauma bei Unfällen im Straßenverkehr, im Haushalt, bei der Arbeit und in der Freizeit, die eine Krankenhausbehandlung erforderlich machen. Bei 30.000 bis 50.000 Patienten sind diese Verletzungen schwer. Ca. 20.000 Patienten müssen operativ versorgt werden. Bei 10.000 Patienten liegen intrakranielle Blutungen vor. Schädel-Hirn-Traumen sind bei ca. 60% aller tödlichen Unfälle und bei 70% der tödlichen Verkehrsunfälle die Todesursache. Die Prognose hängt in erster Linie von einer schnellen und adäquaten ärztlichen Versorgung ab. Diese setzt sich aus

neuroradiologischer Erstdiagnostik, gegebenenfalls der neurochirurgischen Therapie und der intensivmedizinischen Betreuung der Patienten zusammen.

Der Zusammenhang von erhöhten S-100 Konzentrationen im Serum und dem klinischen Ergebnis ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden [115, 245]. Ingebrügsten fand als Erster erhöhte S-100 Konzentrationen im Serum von Patienten, die unmittelbar (im Mittel 3,6 Stunden) zuvor ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten. Diese Werte fielen innerhalb der ersten 12 Stunden auf 50% des Ausgangswertes ab. Auch bei leichten Schädel-Hirn-Traumen fand er erhöhte S-100 Konzentrationen. Allerdings konnte der von ihm verwendete Assay aufgrund der hohen unteren Nachweisgrenze bei gesunden Personen kein S-100 nachweisen, so daß kein Referenzbereich bei Gesunden existierte und insbesondere die erhöhten S-100 Werte bei Patienten mit leichten Schädel-Hirn-Traumen sehr vorsichtig zu interpretieren sind. Zu dem ist es möglich, daß bei den Patienten kein Monotrauma des Kopfes vorlag, so daß das S-100 durchaus auch aus anderen geschädigten Körperregionen stammen kann, da das S-100 nicht spezifisch für das Zentralnervensystem ist.

Mit dem Gelingen, GFAP zuverlässig und empfindlich nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen, ist es erstmalig möglich, ein für das Zentralnervensystem spezifisches Protein zu messen und diese Schwierigkeiten zu überwinden. Bisher gelang es nur mit dem Kollektiv der Schädel-Hirn-Trauma Patienten eine Korrelation zwischen klinisch gesicherten Affektionen des Zentralnervensystems und dem Ansteigen des GFAP-Spiegels im Blut nachzuweisen. Dennoch liegen die Serumspiegel bei nur ca. 10% des Serumspiegels von S-100.

Das Molekulargewicht von GFAP ist mehr als doppelt so hoch, wie das von S-100, so daß für den Übertritt in die Blutbahn neben einem Zelluntergang im

Zentralnervensystem auch eine sehr ausgeprägte Schrankenstörung vorliegen muß. Es könnte jedoch auch ein aktive Sekretion des GFAP von reaktiven Astrozyten vorliegen, die in Verbindung mit einer Schrankenstörung den Übertritt von GFAP in das Blut bewirkt. Dieses ist jedoch nur spekulativ, da der Freisetzungsmechanismus von GFAP bis heute unbekannt ist. Es bleibt also die Frage offen, ob mit der Messung des GFAP-Spiegels im Blut die Menge an untergegangenen Gewebe oder die Kombination aus Schrankenstörung und Aktivität der reaktiven Astrozyten gemessen wird. Des Weiteren erschweren die niedrigen Serumspiegel, knapp oberhalb der Nachweisgrenze der Meßmethode ($=0,01\mu\text{g/l}$), eine Interpretation. Dieses gilt insbesondere auch für andere neurologische Erkrankungen, bei denen die GFAP-Spiegel zum Teil noch niedriger liegen. Hier ist es notwendig die untere Nachweisgrenze nochmals deutlich zu senken.

Die wesentlichen Ergebnisse der hier vorgestellten Studie wurden im Januar 1999 im Journal Clinical Chemistry; Band 45(1); Seite: 138-141, vorgestellt.

9. Schlußfolgerung und Ausblick

Der vorgestellte Assay zur Messung des GFAP-Spiegels im Blut ist ein zuverlässiges und präzises Verfahren. Die Messung von GFAP als Parameter bei neurologischen Erkrankungen ist vielversprechend, da es spezifisch für das Zentralnervensystem ist. In der Liquordiagnostik wurde bereits mehrfach der hohe diagnostische Wert des GFAP dargelegt. Die derzeitige untere Nachweisgrenze von $0,01\mu\text{g/l}$ reicht noch nicht für sichere diagnostische Aussagen aus. Die niedrigen Konzentrationen erfordern ein deutliches Absenken der unteren Nachweisgrenze, die mit den derzeit verfügbaren Methoden nicht so ohne weiteres zu realisieren ist.

Der Nachweis von neuronalen Proteinen im Blut kann allenfalls ergänzend zur bildgebenden Diagnostik eingesetzt werden. Denkbar wäre eine Prognoseeinschätzung in der frühen Phase nach einem akuten neurologischen Ereignis wie zum Beispiel dem Schädel-Hirn-Trauma und eine relativ wenig invasive Maßnahme zur Überwachung von intensivmedizinisch betreuten Patienten, ohne diese der Gefährdung des Transportes und des Umlagerens für die Untersuchung auszusetzen.

Ein gutes Vorbild stellt die Kardiologie dar, in der herzspezifische Marker, wie Troponin I und T im Blut zusammen mit der kardiologisch-bildgebenden Diagnostik wesentliche Bausteine der Herzinfarktdiagnostik darstellen.

10. Zusammenfassung

Seit Jahrzehnten wird versucht, spezifische Proteine oder Peptide zu bestimmen, deren Konzentrationsänderungen im Liquor und oder im Blut eine diagnostische Aussage über den Zustand des ZNS bzw. über das quantitative Ausmaß des Schadens im Gehirn und Rückenmark zulassen. Der Wert eines biochemischen Markers insbesondere bei akuten Ereignissen, ähnlich wie die Herzenzymdiagnostik in der Kardiologie, erscheint hoch. Mit Hilfe der bildgebenden Diagnostik, wie der Computertomographie, der Magnetresonanztomographie und der konventionellen und kernspintomographischen Angiographie konnten enorme Fortschritte in der Diagnostik und Therapie neurologischer Erkrankungsbilder erzielt werden. Dennoch ist und bleibt den zahlreichen Publikationen auf diesem Gebiet zufolge, das Interesse an der Messung und Quantifizierung neuraler Strukturproteine im Liquor und Blut groß.

Als Astrozyten 1846 von Rudolf Virchow erstmalig beschrieben wurden, postulierte er, daß sie die Funktionen von bindegewebigen Stützzellen innehaben. 1870 entwickelte

Golgi histologische Färbetechniken, mit denen der Nachweis solcher nichtneuronalen Zellen ermöglicht wurde. Später wurde diese Färbetechnik von Ramon Y Cajal und de Hortege weiterentwickelt und sie führten eine Klassifikation von Gliazellen ein, die bis heute Gültigkeit besitzt. Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung von Astrozyten und ihrer Funktion war 1971 die Entdeckung von saurem glialen Faserprotein (GFAP). Astrozyten stellen weit mehr als nur ein Gerüst für Neuronen dar und besitzen eine aktive und zentrale Rolle im Zentralnervensystem. Sie sind an der Reparatur des Gewebes nach Schädigung beteiligt, initiieren und steuern die Bildung von Narbengewebe, Neubildung von Gefäßen, erleichtern die Wiederherstellung von Zell-Zellkontakten und den Abtransport von Überresten degenerierter Zellen. Sie besitzen einen regulatorischen Effekt auf entzündliche und immunologische Antworten im Zentralnervensystem. Die Beteiligung an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke ist unbestritten. Eine Reihe von Erkrankungen wie zum Beispiel Virusinfektionen, Schädel-Hirn-Traumen oder Metallintoxikationen gehen mit der Störung der Blut-Hirn-Schranke einher und führen zur vermehrten Ausschüttung von Enzymen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Astrozyten sowohl einen neurotrophen, als auch toxischen Effekt bei der Reparatur des Gewebes nach Schädigung besitzen. Nach akuten Schädigungen des ZNS kommt es zu einem Anstieg von Neurotoxinen, die durch Astrozyten aus dem Extrazellulärraum entfernt und metabolisiert werden. Bei neuronaler Aktivität kommt es zu einem Anstieg von extrazellulärem Kalium. Astrozyten nehmen dieses Kalium auf und stabilisieren so die extrazellulären Ionenkonzentration.

GFAP wurde 1971 von Eng erstmalig aus Multiple Sklerose Plaques isoliert. GFAP ist ein 50 ± 1 kDa großes Protein, welches in einer wasserlöslichen und wasserunlöslichen Form existiert. GFAP gehört zu der Gruppe der Intermediärfilament-Proteine, die am

Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. GFAP konnte bisher nur in Gliazellen und Zellen glialen Ursprungs gefunden werden. Es kommt sowohl in protoplasmatischen Zellen, als auch in fibrösen Astrozyten vor. Der GFAP-Gehalt in protoplasmatischen Astrozyten ist niedrig, während er in fibrösen Astrozyten hoch ist. Die Aggregation von GFAP zu glialen Filamenten wird durch Phosphorylierung, Hormone und Wachstumsfaktoren gesteuert. Der Abbau erfolgt durch Ca^{2+} -abhängige Proteasen.

Fast jede Reaktion von Astrozyten geht mit einer morphologisch sichtbaren Veränderung einher. Die Zellform verändert sich von einer runden protoplasmatischen Zelle mit wenigen Zellfortsätzen in eine verzweigte Zelle mit zahlreichen Zellfortsätzen. Diese Vorgänge sind immer mit einer Vermehrung zytoplasmatischer Filamente und einer Veränderung des GFAP Gehaltes verknüpft. Deshalb ist GFAP ein wichtiger Funktionsmarker.

Bisher konnte GFAP in wäßrigen Gewebsextrakten mittels Immundiffusion und Elektrophorese, Immunradiometrie, Immunelektrophorese und Radioimmunoassays nachgewiesen werden. Die hauptsächlich angewendeten Nachweise beruhen auf immunhistochemischen Verfahren. Es gelang auch GFAP im Liquor mittels Radioimmunoassay und Enzyme Linked Immunosorbent Assay nachzuweisen und bei Erkrankungen, die mit einer Gliose einhergehen, erhöhte GFAP-Konzentrationen nachzuweisen. Man nimmt an, daß bei vielen Erkrankungen des Zentralnervensystems eine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt und es so zu einem Übertritt von GFAP aus dem Zentralnervensystem in die Blutbahn kommt. Mit dem Nachweis von Autoantikörpern konnte bewiesen werden, daß dies tatsächlich der Fall ist. Es gelang ein indirekter Nachweis von GFAP in Körperflüssigkeiten, der allerdings keinen

Rückschluß auf die tatsächliche GFAP-Konzentration erlaubte. Der genaue Mechanismus der Freisetzung ist ungeklärt.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Nachweis von GFAP in humanem Serum basiert auf der Messung von GFAP in humanem Blut mit Hilfe eines zerfallsunterstützten Lanthanide Immunfluoreszenzassays (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay = DELFIA).

Die Messung beruht auf der Bindung von in Standardlösungen und Proben enthaltenem GFAP an Festphasen-Anti-GFAP. Anschließend wird das gebundene GFAP in mehreren Schritten mittels eines anti-GFAP Antikörpers und Europium detektiert. Die Fluoreszenz des gebundenen Europiums wird nach Anregung durch einen Lichtimpuls gemessen und so die in der Probe enthaltene Menge GFAP quantifiziert, die der Menge des gebundenen GFAP proportional ist.

Die untere Nachweisgrenze des Assays liegt bei $<0,01 \mu\text{g/l}$ GFAP. Die Wiederfindung von GFAP bei 10 Proben war 68%-103% für eine erwartete Konzentration von $0,475 \mu\text{g/l}$ und 61%-95% für eine erwartete Konzentration von $4,75 \mu\text{g/l}$. Die analytische Wiederfindung nach 1:1 (V:V) Mischung von zuvor gemessenen Proben lagen in einem Bereich von 91%-111% um die rechnerisch erwarteten Werte. Die Linearität des Assays wurde mit einer Reihenverdünnung von drei Humanseren nach Zugabe von GFAP bestätigt. Die Inter-Assay Varianz liegt bei 4,7% bei einer mittleren Konzentration von $0,2 \mu\text{g/l}$, 4,2% bei einer mittleren Konzentration von $2,0 \mu\text{g/l}$ und bei 3,5% bei einer mittleren Konzentration von $10 \mu\text{g/l}$. Die Inter-Assay Varianz für 43 an 15 Tagen durchgeführte Assays lag bei 8,8% (VK= Variationskoeffizient) bei einer GFAP-Konzentration von $0,74 \mu\text{g/l}$ und 10,4% (VK) bei einer Konzentration von $7,7 \mu\text{g/l}$. Es konnte kein high-dose hook Effekt bei GFAP-Konzentrationen bis $500 \mu\text{g/l}$

festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Lagerungsstabilität erreichten die Differenzen zwischen den innerhalb von 3 Tagen gemessenen GFAP-Konzentrationen keine statistische Signifikanz. Viermaliges Einfrieren und Auftauen der Proben hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die gemessenen GFAP-Konzentrationen. Es wurden 70 Seren von gesunden Blutspendern mit dem Assay gemessen. Bei 9 von 70 Blutproben war GFAP nachweisbar. Ein gültiger Referenzbereich konnte nicht erstellt werden.

Der Zusammenhang von erhöhten S-100 Konzentrationen im Serum und dem klinischen Ergebnis nach Schädel-Hirn-Trauma ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden. Da es möglich ist, daß bei den Patienten kein Monotrauma des Kopfes vorlag und da das S-100 nicht spezifisch für das Zentralnervensystem ist, kann das S-100 durchaus auch aus anderen geschädigten Körpergeweben stammen.

In dieser Arbeit konnte erstmalig GFAP zuverlässig, empfindlich und quantitativ bestimmt werden. Damit wird es erstmalig möglich ein für das Zentralnervensystem spezifisches Protein im Blut zu messen. Uns gelang es mit einem Kollektiv von Schädel-Hirn-Trauma Patienten eine Korrelation zwischen klinisch gesicherten Affektionen des Zentralnervensystems und dem Ansteigen des GFAP-Spiegels im Blut nachzuweisen.

Der Nachweis von neuronalen Proteinen im Blut kann allenfalls ergänzend zur bildgebenden Diagnostik eingesetzt werden. Denkbar wäre eine Prognoseeinschätzung in der frühen Phase nach einem akuten neurologischen Ereignis und zur Überwachung von intensivmedizinisch betreuten Patienten, ohne diese der Gefährdung des Transportes und des Umlagerens für die Untersuchung auszusetzen.

11. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. H. Brückmann, Leiter der Abteilung für Neuroradiologie am Institut für radiologische Diagnostik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mich über die Doktorarbeit hinaus in meiner Ausbildung unterstützte und stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn PD Dr. med. U. Missler, für seine Geduld und unermüdliche Unterstützung während meiner Arbeit im Forschungslabor in München.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. M. Wiesmann, mit dem ich die hier vorgestellte klinische Studie durchgeführt habe.

Ich möchte mich bei meinen Eltern für die in allen Belangen stets rückhaltlose Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Verlobten, die jederzeit Verständnis und große Geduld für meine oft zeitintensiven, beruflichen Aktivitäten aufgebracht hat.

12. Verzeichnisse

12.1. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Intra-Assay Varianz	45
Tabelle 2:	Reihenverdünnung	46
Tabelle 3:	Analytische Wiederfindung	47
Tabelle 4:	Analytische Wiederfindung nach 1:1 (V:V) Mischung	47
Tabelle 5:	Lagerungsstabilität von GFAP	48
Tabelle 6	Stabilität von GFAP bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen	49
Tabelle 7:	Verhalten des GFAP-Assays bei hohen GFAP Konzentrationen	49
Tabelle 8:	Bestimmung der GFAP Konzentrationen in gesunden Personen	50

12.2. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: GFAP-Standardkurve	43
Abbildung 2: Reihenverdünnung von drei Humanserunproben nach Zugabe von GFAP	46
Abbildung 3: Korrelation der S-100- zu den GFAP Werten im Blut von Patienten mit schwerem Schädelhirntrauma.	52

12.3. Literaturverzeichnis

- 1 **Abnet K, Fawcett JW, Dunnett SB.** Interactions between meningeal cells and astrocytes in vivo and in vitro.
Brain Res Dev Brain Res. 1991; 59(2): 187-96.
- 2 **Abney ER, Bartlett PP, Raff MC.** Astrocytes, ependymal cells, and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain.
Dev Biol. 1981; 83(2): 301-10.
- 3 **Aguayo AJ, David S, Bray GM.** Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents.
J Exp Biol. 1981; 95: 231-40.
- 4 **Alberts B, Bay D, Lewis J et al.** In: Molecular Biology of the Cell. 2nd edition, Garland Publishing Inc, New York& London. 1989; pp 661-667.
- 5 **Albrechtsen M, Massaro A, Bock E.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the human glial fibrillary acidic protein using a mouse monoclonal antibody.
J Neurochem. 1985; 44(2): 560-6.
- 6 **Aletta JM, Shelanski ML, Greene LA.** Phosphorylation of the peripherin 58-kDa neuronal intermediate filament protein. Regulation by nerve growth factor and other agents.
J Biol Chem. 1989; 264(8): 4619-27.
- 7 **Aono S, Sato H, Semba R, Kashiwamata S.** Two proteins associated with cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats.
Neurochem Res. 1983; 8(6): 743-56.
- 8 **Aono S, Sato H, Semba R, Kashiwamata S, Eng LF.** Studies on a cerebellar 50,000-dalton protein associated with cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: its identity with glial fibrillary acidic protein as evidenced by the improved immunoblotting method.
J Neurochem. 1985; 44(6): 1877-84.
- 9 **Aono S, Sato H, Semba R, Kashiwamata S, Eng LF.** Studies on a cerebellar 50,000-dalton protein associated with cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: its identity with glial fibrillary acidic protein as evidenced by the improved immunoblotting method.

- J Neurochem. 1985; 44: 1877-84.
- 10 **Aono S, Sato H, Semba R, Kashiwamata S, Kato K, Eng LF.** Comparative study of glial marker proteins in the hypoplastic cerebellum of jaundiced Gunn rats.
J Neurochem. 1988; 50(3): 717-21.
 - 11 **Ard MD, Bunge RP.** Heparan sulfate proteoglycan and laminin immunoreactivity on cultured astrocytes: relationship to differentiation and neurite growth.
J Neurosci. 1988; 8(8): 2844-58.
 - 12 **Asanova LM, Chekhonin VP, Gavrilenko A.** Enzyme immunoassay of neurospecific proteins in the serum of epileptic patients.
Zh-Neuropatol Psikiatr Im S S Korsakova. 1995; 95: 30-31.
 - 13 **Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Olsson JE, Zbornikova V, Haglid KG.** Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction.
Stroke. 1991; 22(10): 1254-8.
 - 14 **Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Olsson JE, Zbornikova V, Haglid KG.** The S-100 protein in cerebrospinal fluid: a simple ELISA method.
J Neurol Sciences. 1989; 89: 157-64.
 - 15 **Bakhit C, Armanini M, Bennett GL, Wong WL, Hansen SE, Taylor R.** Increase in glia-derived nerve growth factor following destruction of hippocampal neurons.
Brain Res. 1991; 560(1-2): 76-83.
 - 16 **Balcarek JM, Cowan NJ.** Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: implications for the evolution of the intermediate filament multigene family.
Nucleic Acids Res. 1985; 13(15): 5527-43.
 - 17 **Banda MJ, Rice AG, Griffin GL, Senior RM.** The inhibitory complex of human alpha 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant.
J Exp Med. 1988; 167(5): 1608-15.
 - 18 **Banker GA.** Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture.
Science. 1980; 209(4458): 809-10.

- 19 **Battaglioli G, Martin DL.** Stimulation of synaptosomal gamma-aminobutyric acid synthesis by glutamate and glutamine.
J Neurochem. 1990; 54(4): 1179-87.
- 20 **Battaglioli G, Martin DL.** GABA synthesis in brain slices is dependent on glutamine produced in astrocytes.
Neurochem Res. 1991; 16(2): 151-6.
- 21 **Beems T, Simons KS, VanGeel WJ, DeReus HP, Vos PE, Verbeek MM.** Serum- and CSF-concentrations of brain specific proteins in hydrocephalus.
Acta Neurochir (Wien). 2003; 145(1): 37-43.
- 22 **Beguin P, Shooter EM, Eng LF.** Cell-free synthesis of glial fibrillary acidic protein.
Neurochem Res. 1980; 5(5): 513-21.
- 23 **Besnard F, Perraud F, Sensenbrenner M, Labourdette G.** Platelet-derived growth factor is a mitogen for glial but not for neuronal rat brain cells in vitro.
Neurosci Lett. 1987; 73(3): 287-92.
- 24 **Betz AL, Goldstein GW, Katzman R.** Blood-brain -cerebrospinal fluid barriers
In: Basic Neurochemistry : Molecular, Cellular and Medical Aspects. 4th edition, Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P, Raven Press, New York. 1989; pp 591-606.
- 25 **Bigbee JW, Eng LF.** Analysis and comparison of in vitro synthesized glial fibrillary acidic protein with rat CNS intermediate filament proteins.
J Neurochem. 1982; 38(1): 130-4.
- 26 **Bignami A, Dahl D.** Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein.
J Comp Neurol. 1974; 153(1): 27-38.
- 27 **Bignami A, Dahl D.** Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein.
Brain Res. 1976; 116(1): 150-7.
- 28 **Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT.** Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence.
Brain Res. 1972; 43(2): 429-35.

- 29 **Billiau A, Heremans H, Vandekerckhove F, Dijkmans R, Sobis H, Meulepas E, Carton H.** Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma.
J Immunol. 1988; 140(5): 1506-10.
- 30 **Bissell MG, Rubinstein LJ, Bignami A, Herman MM.** Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture systems. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis.
Brain Res. 1974; 82(1): 77-89.
- 31 **Bjorklund H, Eriksdotter-Nilsson M, Dahl D, Olson L.** Astrocytes in smears of CNS tissues as visualized by GFA and vimentin immunofluorescence.
Med Biol. 1984; 62(1): 38-48.
- 32 **Blennow M, Hagberg H, Rosengren L.** Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid: a possible indicator of prognosis in full-term asphyxiated newborn infants?
Pediatr Res. 1995; 37(3): 260-4.
- 33 **Blennow M, Hagberg H, Rosengren L.** Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid: a possible indicator of prognosis in full-term asphyxiated newborn infants?
Pediatr Res. 1995; 37(3): 260-4.
- 34 **Blennow M, Rosengren L, Jonsson S, Forssberg H, Katz-Salamon M, Hagberg H, Hesser U, Lagercrantz H.** Glial fibrillary acidic protein is increased in the cerebrospinal fluid of preterm infants with abnormal neurological findings.
Acta Paediatr. 1996; 85(4): 485-9.
- 35 **Blennow M, Rosengren L, Jonsson S, Forssberg H, Katz-Salamon M, Hagberg H, Hesser U, Lagercrantz H.** Glial fibrillary acidic protein is increased in the cerebrospinal fluid of preterm infants with abnormal neurological findings.
Acta Paediatr. 1996; 85(4): 485-9.
- 36 **Bloemendal H, Pieper FR.** Intermediate filaments: known structure, unknown function.
Biochim Biophys Acta. 1989; 1007(3): 245-53.
- 37 **Bovolenta P, Liem RK, Mason CA.** Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content.

- Dev Biol. 1984; 102(1): 248-59.
- 38 **Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ.** Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I.
J Biol Chem. 1990; 265(29): 17805-15.
- 39 **Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM.** Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system.
J Clin Invest. 1985; 76(4): 1501-13.
- 40 **Bressler JP, Grotendorst GR, Levitov C, Hjelmeland LM.** Chemotaxis of rat brain astrocytes to platelet derived growth factor.
Brain Res. 1985; 344(2): 249-54.
- 41 **Brightman MW, Klatzo I, Olsson Y, Reese TS.** The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions.
J Neurol Sci. 1970; 10(3): 215-39.
- 42 **Brightman MW, Reese TS.** Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain.
J Cell Biol. 1969; 40(3): 648-77.
- 43 **Brockes JP, Lemke GE, Balzer DR Jr.** Purification and preliminary characterization of a glial growth factor from the bovine pituitary.
J Biol Chem. 1980; 255(18): 8374-7.
- 44 **Browning ET, Ruina M.** Glial fibrillary acidic protein: norepinephrine stimulated phosphorylation in intact C-6 glioma cells.
J Neurochem. 1984; 42(3): 718-26.
- 45 **Calvo JL, Carbonell AL, Boya J.** Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve.
Brain Res. 1990; 532(1-2): 355-7.
- 46 **Camenga DL, Johnson KP, Alter M, Engelhardt CD, Fishman PS, Greenstein JI, Haley AS, Hirsch RL, Kleiner JE, VY Kofie et al.** Systemic recombinant alpha-2 interferon therapy in relapsing multiple sclerosis.
Arch Neurol. 1986; 43(12): 1239-46.
- 47 **Cammer W, Tansey FA, Brosnan CF.** Reactive gliosis in the brains of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis.

- J Neuroimmunol. 1990; 27(2-3): 111-20.
- 48 **Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L.** Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(21): 10061-5.
- 49 **Caroni P, Becker M.** The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF1.
J Neurosci. 1992; 12(10): 3849-61.
- 50 **Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA.** Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice.
Neuron. 1993; 10(4): 729-40.
- 51 **Chekhonin VP, Baklaushev VP, Gurina OI, Dmitrieva TB, Savchenko EA, Lazarenko IP, Lebedev SV, Belopasov VV.** Immunoenzyme assay of glial fibrillary acidic protein for evaluation of functional activity of cell grafts from embryonic ventral mesencephalon in rats with experimental hemiparkinsonism. V. P. Serbskii Center of Social and Criminal Psychiatry, Moscow.
- 52 **Cheng B, Mattson MP.** NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis.
Neuron. 1991; 7(6): 1031-41.
- 53 **Chiu FC, Goldman JE.** Regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in CNS development and in pathological states.
J Neuroimmunol. 1985; 8(4-6): 283-92.
- 54 **Chiu FC, Norton WT, Fields KL.** The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein, and the fibroblast-type filament protein, vimentin.
J Neurochem. 1981; 37(1): 147-55.
- 55 **Choi BH, Lapham LW.** Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study.
Brain Res. 1978; 148(2): 295-311.

- 56 **Choi BH, Suzuki M, Kim T, Wagner SL, Cunningham DD.** Protease nexin-1. Localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases.
Am J Pathol. 1990; 137(4): 741-7.
- 57 **Choi DW.** Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.
Neuron. 1988; 1(8): 623-34.
- 58 **Cielski-Treska J, Goetschy JF, Ulrich G et al.** In: The cytoskeleton in Cell differentiation and development 8. Maccioni RB and Arechaga J, IRL Press, Oxford Washington DC. 1987; pp 153-155.
- 59 **Ciesielski-Treska J, Goetschy JF, Aunis D.** Proteolytic degradation of vimentin and glial fibrillary acidic protein in rat astrocytes in primary culture.
Eur J Biochem. 1984; 138(3): 465-71.
- 60 **Connor JR, Menzies SL, Martin SM St, Mufson EJ.** A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains.
J Neurosci Res. 1992; 31(1): 75-83.
- 61 **Dahl D.** Glial fibrillary acidic protein from bovine and rat brain. Degradation in tissues and homogenates.
Biochim Biophys Acta. 1976; 420(1): 142-54.
- 62 **Dahl D, Bignami A.** Glial fibrillary acidic protein from normal human brain. Purification and properties.
Brain Res. 1973; 57(2): 343-60.
- 63 **David S, Bouchard C, Tsatas O, Giftochristos N.** Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system.
Neuron. 1990; 5(4): 463-9.
- 64 **DeArmond SJ, Eng LF, Rubinstein LJ.** The application of glial fibrillary acidic (GFA) protein immunohistochemistry in neurooncology. A progress report.
Pathol Res Pract. 1980; 168(4): 374-94.
- 65 **DeArmond SJ, Fajardo M, Naughton SA, Eng LF.** Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase: an electroblot study.
Brain Res. 1983; 262(2): 275-82.
- 66 **DeArmond SJ, Lee YL, Kretzschmar HA, Eng LF.** Turnover of glial filaments in mouse spinal cord.
J Neurochem. 1986; 47(6): 1749-53.

- 67 **Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W 2nd, Haase AT.** Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes.
J Virol. 1991; 65(9): 4759-68.
- 68 **Dittmann L, Axelsen NH, Norgaard-Pedersen B, Bock E.** Antigens in human glioblastomas and meningiomas: Search for tumour and onco-foetal antigens. Estimation of S-100 and GFA protein.
Br J Cancer. 1977; 35(2): 135-41.
- 69 **Dotevall L, Rosengren LE, Hagberg L.** Increased cerebrospinal fluid levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in Lyme neuroborreliosis.
Infection. 1996; 24(2): 125-9.
- 70 **Duchesne PY, Gheuens J, Brotchi J, Gerebtzoff MA.** Normal and reactive astrocytes: a comparative study by immunohistochemistry and by a classical histological technique.
Cell Mol Biol. 1979; 24(3): 237-9.
- 71 **Dwyer BE, Nishimura RN, Vellis J De, Yoshida T.** Heme oxygenase is a heat shock protein and PEST protein in rat astroglial cells.
Glia. 1992; 5(4): 300-5.
- 72 **Dwyer N, Blobel G.** A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei.
J Cell Biol. 1976; 70(3): 581-91.
- 73 **Eckenhoff MF, Rakic P.** Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey.
J Comp Neurol. 1984; 223(1): 1-21.
- 74 **Eddleston M, Torre JC de la, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N.** Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis.
J Clin Invest. 1993; 92(1): 349-58.
- 75 **Ehlers S, Kyllerman M, Rosengren L.** Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of children investigated for encephalopathy.
Neuropediatrics. 1994; 25: 134-39.

- 76 **Eng LF.** The glial fibrillary acidic protein In: Proteins of the nervous system. 2nd edition, Bradshaw RA, Schneider DM, eds, Raven Press, New York. 1980; pp 85-117.
- 77 **Eng LF.** The glial fibrillary acidic protein: the major protein constituent of glial filaments. Scand J Immunol Suppl. 1982; 9: 41-51.
- 78 **Eng LF, Armond SJ.** In: Progress in Neuropathology 5. Zimmermann H.M., Raven Press, New York. 1983; pp 19-39.
- 79 **Eng LF, Lee YL, Miles LE.** Measurement of glial fibrillary acidic protein by a two-site immunoradiometric assay. Anal Biochem. 1976; 71(1): 243-59.
- 80 **Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B.** An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res. 1971; 28(2): 351-4.
- 81 **Evans RM.** Cyclic AMP-dependent protein kinase-induced vimentin filament disassembly involves modification of the N-terminal domain of intermediate filament subunits. FEBS Lett. 1988; 234(1): 73-8.
- 82 **Evans T, McCarthy KD, Harden TK.** Regulation of cyclic AMP accumulation by peptide hormone receptors in immunocytochemically defined astroglial cells. J Neurochem. 1984; 43(1): 131-8.
- 83 **Ewing JF, Haber SN, Maines MD.** Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. J Neurochem. 1992; 58(3): 1140-9.
- 84 **Fierz W, Fontana A.** The role of astrocytes in the interaction between the immune and nervous system In: Astrocytes. Cell Biology and Pathology of Astrocytes. Academic Press, Orlando. 1986; pp 203-229.
- 85 **Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G.** cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83(17): 6450-4.
- 86 **Flott B, Seifert W.** Characterization of glutamate uptake systems in astrocyte primary cultures from rat brain.

- Glia. 1991; 4(3): 293-304.
- 87 **Fontana A, Erb P, Pircher H, Zinkernagel R, Weber E, Fierz W.** Astrocytes as antigen-presenting cells. Part II: Unlike H-2K-dependent cytotoxic T cells, H-2Ia-restricted T cells are only stimulated in the presence of interferon-gamma. J Neuroimmunol. 1986; 12(1): 15-28.
- 88 **Fontana A, Fierz W, Wekerle H.** Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. Nature. 1984; 307(5948): 273-6.
- 89 **Frohman EM, Noort S van den, Gupta S.** Astrocytes and intracerebral immune responses. J Clin Immunol. 1989; 9(1): 1-9.
- 90 **Geisler N, Kaufmann E, Weber K.** Proteinchemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. Cell. 1982; 30(1): 277-86.
- 91 **Geisler N, Weber K.** Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. EMBO J. 1988; 7(1): 15-20.
- 92 **Gerace L, Blobel G.** The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. Cell. 1980; 19(1): 277-87.
- 93 **Gilbert DS, Newby BJ.** Neurofilament disguise, destruction and discipline. Nature. 1975; 256(5518): 586-9.
- 94 **Giulian D.** Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. J Neurosci Res. 1987; 18(1): 155-71, 132-3.
- 95 **Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB.** Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. J Neurosci Res. 1988; 8(2): 709-14.
- 96 **Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K.** A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. Biochem Biophys Res Commun. 1992; 182(2): 593-9.

- 97 **Gocht A, Lohler J.** Changes in glial cell markers in recent and old demyelinated lesions in central pontine myelinolysis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1990; 80(1): 46-58.
- 98 **Halliwell B.** Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992; 59(5): 1609-23.
- 99 **Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine* In., Clarendon Press, Oxford. 1985.
- 100 **Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA.** Astroglia in CNS injury. *Glia*. 1991; 4(2): 233-43.
- 101 **Hayakawa T, Ushio Y, Mori T, Arita N, Yoshimine T, Maeda Y, Shimizu K, Myoga A.** Levels in stroke patients of CSF astroprotein, an astrocyte-specific cerebroprotein. *Stroke*. 1979; 10(6): 685-9.
- 102 **Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, deBruijn CH, Lamers KJ.** Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*. 2000; 31(11): 2670-7.
- 103 **Hertz L, McFarlin DE, Waksman BH.** Astrocytes: auxiliary cells for immune responses in the central nervous system? *Immunol Today*. 1990; 11(8): 265-8.
- 104 **Hertz L, Schousboe A.** Role of astrocytes in compartmentation of amino acids and energy metabolism In: *Astrocytes. Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Fedoroff S, Vernadakis A, Academic Press, Orlando. pp 179-208.
- 105 **Hickey WF, Kimura H.** Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(7): 2082-6.
- 106 **Hickey WF, Kimura H.** Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*. 1988; 239(4837): 290-2.
- 107 **Hickey WF, Osborn JP, Kirby WM.** Expression of Ia molecules by astrocytes during acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Cell Immunol*. 1985; 91(2): 528-35.

- 108 **Hoffmann MC, Nitsch C, Scotti AL, Reinhard E, Monard D.** The prolonged presence of glia-derived nexin, an endogenous protease inhibitor, in the hippocampus after ischemia-induced delayed neuronal death. *Neuroscience*. 1992; 49(2): 397-408.
- 109 **Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE.** Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 1989; 170(2): 607-12.
- 110 **Hösli E, Schousboe A, Hösli L.** Amino acid uptake In: Astrocytes. *Biochemistry, Physiology and Pharmacology of Astrocytes*. Fedoroff S, Vernadakis A, Academic Press, Orlando. pp 133-153.
- 111 **Huc C, Escurat M, Djabali K, Derer M, Landon F, Gros F, Portier MM.** Phosphorylation of peripherin, an intermediate filament protein, in mouse neuroblastoma NIE 115 cell line and in sympathetic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 160(2): 772-9.
- 112 **Inagaki M, Gonda Y, Matsuyama M, Nishizawa K, Nishi Y, Sato C.** Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin. *J Biol Chem*. 1988; 263(12): 5970-8.
- 113 **Inagaki M, Nishi Y, Nishizawa K, Matsuyama M, Sato C.** Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature*. 1987; 328(6131): 649-52.
- 114 **Ingebrigsten T, Romner B.** Serial S-100 protein measurements related to early magnetic resonance imaging after minor head injury. *J Neurosurg*. 1996; 85: 945-48.
- 115 **Ingebrigsten T, Romner B, Langbakk B.** Increased serum concentrations of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995; 59: 103-4.
- 116 **Johnson KP.** Treatment of multiple sclerosis with various interferons: the cons. *Neurology*. 1988; 38(7 Suppl 2): 62-5.
- 117 **Johnson LS, Sinex FM.** On the relationship of brain filaments to microtubules. *J Neurochem*. 1974; 22(3): 321-6.
- 118 **Johnson-Green PC, Dow KE, Riopelle RJ.** Characterization of glycosaminoglycans produced by primary astrocytes in vitro.

- Glia. 1991; 4(3): 314-21.
- 119 **Karwoski CJ, Lu HK, Newman EA.** Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Muller (glial) cells. Science. 1989; 244(4904): 578-80.
 - 120 **Kashiwamata S, Aono S, Semba RK.** Characteristic changes of cerebellar proteins associated with cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats and the prevention of these by phototherapy. Experientia. 1980; 36(10): 1143-4.
 - 121 **Kato K, Kimura S, Semba R, Suzuki F, Nakajima T.** Increase in S-100 protein levels in blood plasma by epinephrine. J Biochem. 1983; 94: 1009-11.
 - 122 **Kato K, Nakayima T, Ishiguro Y, Matsutani T.** Sensitive enzyme immunoassay for S-100 protein: Determination in human cerebrospinal fluid. Biomed Res. 1982; 3: 24-8.
 - 123 **Kato T, Ito J, Ishikawa K, Mizutani K, Tanaka R, Wakabayashi S, Horiuchi I, Kato K, Kano-Tanaka K.** The absence of differentiation-promoting response of astroglia cells to glia maturation factor. Brain Res. 1984; 301(1): 83-93.
 - 124 **Kawaja MD, Gage FH.** Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. Neuron. 1991; 7(6): 1019-30.
 - 125 **Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL.** Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. Am J Pathol. 1992; 140(3): 691-707.
 - 126 **Keelan JA, France JT, Barling PM.** An alternative enhancement solution for use in lanthanide-based time resolved fluoroimmunoassays. Clin Chem. 1987; 33: 2292-95.
 - 127 **Kitamura T, Nakanishi K, Watanabe S, Endo Y, Fujita S.** GFA-protein gene expression on the astroglia in cow and rat brains. Brain Res. 1987; 423(1-2): 189-95.
 - 128 **Knobler RL, Panitch HS, Braheny SL, Sipe JC, Rice GP, Huddleston JR, Francis GS, Hooper CK, Kamin-Lewis RM, KP Johnson KP et al.** Systemic alpha-interferon therapy of multiple sclerosis. Neurology. 1984; 34(10): 1273-9.

- 129 **Koh JY, Yang LL, Cotman CW.** Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* 1990; 533(2): 315-20.
- 130 **Koj A, Magielska-Zero D, Kurdowska A, Bereta J.** Proteinase inhibitors as acute phase reactants: regulation of synthesis and turnover. *Adv Exp Med Biol.* 1988; 240: 171-81.
- 131 **Kuffler SW.** Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1967; 168(10): 1-21.
- 132 **Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK.** Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* 1966; 29(4): 768-87.
- 133 **Kurdowska A, Travis J.** Acute phase protein stimulation by alpha 1-antichymotrypsin-cathepsin G complexes. Evidence for the involvement of interleukin-6. *J Biol Chem.* 1990; 265(34): 21023-6.
- 134 **Larkfors L, Stromberg I, Ebendal T, Olson L.** Nerve growth factor protein level increases in the adult rat hippocampus after a specific cholinergic lesion. *J Neurosci Res.* 1987; 18(4): 521-31.
- 135 **Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF.** Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res.* 1991; 28(2): 236-43.
- 136 **Lawrence JM, Morris RJ, Wilson DJ, Raisman G.** Mechanisms of allograft rejection in the rat brain. *Neuroscience.* 1990; 37(2): 431-62.
- 137 **Lazarides E.** Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1982; 51: 219-50.
- 138 **Lee WH, Clemens JA, Bondy CA.** Insulin like growth factors in the response to cerebral ischemia. *Mol cell Neurosci.* 1992; 3: 36-43.
- 139 **Leonard DG, Gorham JD, Cole P, Greene LA, Ziff EB.** A nerve growth factor-regulated messenger RNA encodes a new intermediate filament protein. *J Cell Biol.* 1988; 106(1): 181-93.

- 140 **Levitt P, Rakic P.** Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain.
J Comp Neurol. 1980; 193(3): 815-40.
- 141 **Lewis SA, Balcarek JM, Krek V, Shelanski M, Cowan NJ.** Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81(9): 2743-6.
- 142 **Liem R.** Simultaneous separation and purification of neurofilament and glial filament proteins from brain.
J Neurochem. 1982; 38(1): 142-50.
- 143 **Lim R, Miller JF, Zaheer A.** Purification and characterization of glia maturation factor beta: a growth regulator for neurons and glia.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86(10): 3901-5.
- 144 **Lim R, Mitsunobu K.** Brain cells in culture: morphological transformation by a protein.
Science. 1974; 185(145): 63-6.
- 145 **Lim R, Mitsunobu K, Li WK.** Maturation-stimulation effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on dissociated embryonic brain cells in culture.
Exp Cell Res. 1973; 79(1): 243-6.
- 146 **Lim R, Turriff DE, Troy SS, Moore BW, Eng LF.** Glia maturation factor: effect on chemical differentiation of glioblasts in culture.
Science. 1977; 195(4274): 195-6.
- 147 **Lipton SA.** Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor?
Trends Neurosci. 1992; 15(3): 75-9.
- 148 **Liu Y, King N, Kesson A, Blanden RV, Mullbacher A.** Flavivirus infection up-regulates the expression of class I and class II major histocompatibility antigens on and enhances T cell recognition of astrocytes in vitro.
J Neuroimmunol. 1989; 21(2-3): 157-68.
- 149 **Liuzzi FJ, Lasek RJ.** Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway.
Science. 1987; 237(4815): 642-5.

- 150 **Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, Sporn MB, Baird A.** Enhanced expression of transforming growth factor beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury.
Brain Res. 1992; 587(2): 216-25.
- 151 **Lopez OL, Rabin BS, Huff FJ, Rezek D, Reinmuth OM.** Serum autoantibodies in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia and in nondemented control subjects.
Stroke. 1992; 23(8): 1078-83.
- 152 **Lopez-Munoz F, Calvo JL, Boya J, Carbonell AL.** Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in glial cells of the adult rat pineal gland.
J Pineal Res. 1992; 12(4): 145-8.
- 153 **Lowenthal A, Noppe M, Gheuens J, Karcher D.** Alpha-Albumin (glial fibrillary acidic protein) in normal and pathological human brain and cerebrospinal fluid.
J Neurol Sci. 1978; 219(2): 87-91.
- 154 **Lu B, Yokoyama M, Dreyfus CF, Black IB.** NGF gene expression in actively growing brain glia.
J Neurosci. 1991; 11(2): 318-26.
- 155 **Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF.** The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies.
J Comp Neurol. 1976; 165(2): 197-207.
- 156 **Manthorpe M, Rudge JS, Varon S.** Astroglial cell contributions to neuronal survival and neuritic growth In: Astrocytes, Biochemistry, Physiology and Pharmacology in Astrocytes. Academic Press, Orlando. 1986; pp 315-376.
- 157 **Matsumoto Y, Hara N, Tanaka R, Fujiwara M.** Immunohistochemical analysis of the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis, with special reference to Ia-positive cells with dendritic morphology.
J Immunol. 1986; 136(10): 3668-76.
- 158 **Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE.** Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity.
J Neurosci. 1992; 12(2): 376-89.

- 159 **Mattson MP, Murrain M, Guthrie PB, Kater SB.** Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture.
J Neurosci. 1989; 9(11): 3728-40.
- 160 **Mattson MP, Rychlik B.** Glia protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced degeneration: involvement of fibroblast growth factor.
Int J Dev Neurosci. 1990; 8(4): 399-415.
- 161 **McKeon FD, Kirschner MW, Caput D.** Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins.
Nature. 1986; 319(6053): 463-8.
- 162 **McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J.** Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes.
J Neurosci. 1991; 11(11): 3398-411.
- 163 **Michetti F, Massaro A, Russo G, Rigon G.** The S-100 antigen in cerebrospinal fluid as a possible index of cell injury in the nervous system.
J Neurol Sci. 1980; 44(2-3): 259-63.
- 164 **Mikoshiba K, Nagaike K, Aoki E, Tsukada Y.** Biochemical and immunohistochemical studies on dysmyelination of quaking mutant mice in vivo and in vitro.
Brain Res. 1979; 177(2): 287-99.
- 165 **Missler U, Orlowski N, Notzold A, Dibbelt L, Steinmeier E, Wiesmann M.** Early elevation of S-100B protein in blood after cardiac surgery is not a predictor of ischemic cerebral injury.
Clin Chim Acta. 2002; 321(1-2): 29-33.
- 166 **Missler U, Wiesmann M.** Measurement of of S-100 protein in human blood and cerebrospinal fluid: analytical method and preliminary results.
Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1995; 33: 743-8.
- 167 **Moore BW.** A soluble protein characteristic of the nervous system.
Biochem Biophys Res Commun. 1965; 19: 739-44.
- 168 **Mori T, Morimoto K, Hayakawa T, Ushio Y, Mogami H, Sekiguchi K.** Radioimmunoassay of astroprotein (an astrocyte-specific cerebroprotein) in cerebrospinal fluid and its clinical significance.

- Neurol Med Chir (Tokyo). 1978; 18(1 Pt 1): 25-31.
- 169 **Mori T, Morimoto K, Ushio Y, Hayakawa T, Mogami H.** Radioimmunoassay of astroprotein (an astrocyte-specific cerebroprotein) in cerebrospinal fluid from patients with glioma. A preliminary study.
Neurol Med Chir (Tokyo). 1975; 15 pt 1: 23-5.
- 170 **Morrison RS, Sharma A, Vellis J de, Bradshaw RA.** Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83(19): 7537-41.
- 171 **Morrison RS, Vellis J De, Lee YL, Bradshaw RA, Eng LF.** Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes.
J Neurosci Res. 1985; 14(2): 167-76.
- 172 **Mozell RL, McMorris FA.** Insulin-like growth factor I stimulates oligodendrocyte development and myelination in rat brain aggregate cultures.
J Neurosci Res. 1991; 30(2): 382-90.
- 173 **Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, Nerenberg MI.** Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury.
New Biol. 1991; 3(5): 465-74.
- 174 **Murakami M, Ushio Y, Morino Y, Ohta T, Matsukado Y.**
Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in human glial neoplasms.
J Clin Invest. 1988; 82(1): 177-88.
- 175 **Nelson WJ, Traub P.** Proteolysis of vimentin and desmin by the Ca²⁺-activated proteinase specific for these intermediate filament proteins.
Mol Cell Biol. 1983; 3(6): 1146-56.
- 176 **Newman EA.** Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells.
J Neurosci. 1993; 13(8): 3333-45.
- 177 **Nishimura N, Nishimura H, Ghaffar A, Tohyama C.** Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse.
J Histochem Cytochem. 1992; 40(2): 309-15.
- 178 **Noppe M, Crols R, Andreis D, Lowenthal A.** Determination in human cerebrospinal fluid of glial fibrillary acidic protein, S-100, and myelin basic protein as indices of non-specific or specific central nervous tissue pathology.

- Clin Chim Acta. 1986; 155: 143-50.
- 179 **Noppe M, Lowenthal A, Karcher D, Gheuens J.** A two-site immunoradiometric assay for the determination of alpha-albumin. J Immunol Methods. 1979; 27(1): 75-81.
- 180 **Norenberg MD.** Immunohistochemistry of glutamine synthetase In: Glutamine, -glutamate and GABA in the CNS. Hertz L, A.R. Liss, New York. pp 95-111.
- 181 **O'Callaghan JP, Miller DB.** Cerebellar hypoplasia in the Gunn rat is associated with quantitative changes in neurotypic and gliotypic proteins. J Pharmacol Exp Ther. 1985; 234(2): 522-33.
- 182 **Orita T, Akimura T, Nishizaki T, Kamiryo T, Ikeyama Y, Aoki H, Ito H.** Transferrin receptors in injured brain. Acta Neuropathol (Berl). 1990; 79(6): 686-8.
- 183 **Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW.** Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. J Neurophysiol. 1966; 29(4): 788-806.
- 184 **Palfreyman JW, Thomas DG, Ratcliffe JG, Graham DI.** Glial fibrillary acidic protein (GFAP): purification from human fibrillary astrocytoma, development and validation of a radioimmunoassay for GFAP-like immunoactivity. J Neurol Sci. 1979; 41(1): 101-13.
- 185 **Pappolla MA, Omar RA, Kim KS, Robakis NK.** Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. Am J Pathol. 1992; 140(3): 621-8.
- 186 **Peitsch MC, Boguski MS.** Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? New Biol. 1990; 2(2): 197-206.
- 187 **Pekny M, Leveen P, Pekna M, Eliasson C, Berthold CH, Westermarck B, Betsholtz C.** Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. EMBO J. 1995; 14(8): 1590-8.
- 188 **Perraud F, Besnard F, Labourdette G, Sensenbrenner M.** Proliferation of rat astrocytes, but not of oligodendrocytes, is stimulated in vitro by protease inhibitors.

- Int J Dev Neurosci. 1988; 6(3): 261-6.
- 189 **Persson L, Hardemark HG, Gustaffson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pahlman S.** S-100 protein and neuron-specific enolase in serum and cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis in comparison to controls. Stroke. 1987; 18: 911-18.
- 190 **Peters A, Palay SL, Webster H de F.** Blood vessels. In the fine structure of the nervous system In: Neurons and their supporting cells 3rd edn. Oxford University Press, New York. 1991; pp 344-355.
- 191 **Pettmann B, Sensenbrenner M, Labourdette G.** Isolation of a glial maturation factor from beef brain. FEBS Lett. 1980; 118(2): 195-9.
- 192 **Pollenz RS, McCarthy KD.** Analysis of cyclic AMP-dependent changes in intermediate filament protein phosphorylation and cell morphology in cultured astroglia. J Neurochem. 1986; 47(1): 9-17.
- 193 **Portier MM, Brachet P, Croizat B, Gros F.** Regulation of peripherin in mouse neuroblastoma and rat PC 12 pheochromocytoma cell lines. Dev Neurosci. 1983-84; 6(4-5): 215-26.
- 194 **Portier MM, Nechaud B de, Gros F.** Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. Dev Neurosci. 1983-84; 6(6): 335-44.
- 195 **Raju T, Bignami A, Dahl D.** In vivo and in vitro differentiation of neurons and astrocytes in the rat embryo. Immunofluorescence study with neurofilament and glial filament antisera. Dev Biol. 1981; 85(2): 344-57.
- 196 **Razzaboni BL, Papastoitsis G, Koo EH, Abraham CR.** A calcium-stimulated serine protease from monkey brain degrades the beta-amyloid precursor protein. Brain Res. 1992; 589(2): 207-16.
- 197 **Reese TS, Feder N, Brightman MW.** Electron microscopic study of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers with microperoxidase. J Neuropathol Exp Neurol. 1971; 30(1): 137-8.
- 198 **Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA.** Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86(13): 5178-82.

- 199 **Reier PJ.** Gliosis following CNS injury: the anatomy of astrocytic scars and their influences on axonal elongation In: *Astrocytes. Cell Biology and Pathology of Astrocytes.* 1986; pp 263-324.
- 200 **Reier PJ, Eng LF, Jakeman L.** Reactive astrocyte and axonal outgrowth in the injured CNS: is gliosis really an impediment to regeneration? In: *Neuronal Regeneration and Transplantation.* Seil FJ, Alan R Liss New York. 1989; pp 183-209.
- 201 **Reier PJ, Stensaas LJ, Guth L.** The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system In: *Spinal Cord Reconstruction.* Raven Press, New York. 1983; pp 163-195.
- 202 **Robbins DS, Shirazi Y, Drysdale BE, Lieberman A, Shin HS, Shin ML.** Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol.* 1987; 139(8): 2593-7.
- 203 **Rosenberg PA.** Accumulation of extracellular glutamate and neuronal death in astrocyte-poor cortical cultures exposed to glutamine. *Glia.* 1991; 4(1): 91-100.
- 204 **Rosenberg PA, Amin S, Leitner M.** Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci.* 1992; 12(1): 56-61.
- 205 **Rosengren LE, Ahlsen G, Belfrage M, Gillberg C, Haglid KG, Hamberger A.** A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of children. *J Neurosci Methods.* 1992; 44(2-3): 113-9.
- 206 **Rosengren LE, Lycke J, Andersen O.** Glial fibrillary acidic protein in CSF of multiple sclerosis patients: relation to neurological deficit. *J Neurol Sci.* 1995; 133: 61-5.
- 207 **Rosengren LE, Wikkelso C, Hagberg L.** A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of adults. *J Neurosci Methods.* 1994; 51(2): 197-204.
- 208 **Rueger DC, Dahl D, Bignami A.** Purification of a brain-specific astroglial protein by immunoaffinity chromatography. *Anal Biochem.* 1978; 89(2): 360-71.

- 209 **Rueger DC, Gardner EE, Simonian H Der, Dahl D, Bignami A.** Purified glial fibrillary acidic protein and desmin are distinct intermediate filament proteins exhibiting similar properties.
J Biol Chem. 1981; 256(20): 10606-12.
- 210 **Schachner M, Hedley-Whyte ET, Hsu DW, Schoonmaker G, Bignami A.** Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling.
J Cell Biol. 1977; 75(1): 67-73.
- 211 **Schipper HM.** Gomori-positive astrocytes: biological properties and implications for neurologic and neuroendocrine disorders.
Glia. 1991; 4(4): 365-77.
- 212 **Schlaepfer WW, Zimmerman UP.** Calcium-mediated breakdown of glial filaments and neurofilaments in rat optic nerve and spinal cord.
Neurochem Res. 1981; 6(3): 243-55.
- 213 **Schnitzer J, Franke WW, Schachner M.** Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system.
J Cell Biol. 1981; 90(2): 435-47.
- 214 **Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF.** Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions.
J Clin Invest. 1991; 87(3): 949-54.
- 215 **Selmaj KW, Raine CS.** Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro.
Ann Neurol. 1988; 23(4): 339-46.
- 216 **Senior RM, Huang SS, Griffin GL, Huang JS.** Brain-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts and astroglial cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1986; 141(1): 67-72.
- 217 **Sensenbrenner M, Devilliers G, Bock E, Porte A.** Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells: effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on glial fibrillary acidic protein and glial filaments.
Differentiation. 1980; 17(1): 51-61.
- 218 **Shafit-Zagardo B, Peterson C, Goldman JE.** Rapid increases in glial fibrillary acidic protein mRNA and protein levels in the copper-deficient, brindled mouse.
J Neurochem. 1988; 51(4): 1258-66.

- 219 **Sharp G, Osborn M, Weber K.** Occurrence of two different intermediate filament proteins in the same filament in situ within a human glioma cell line. An immunoelectron microscopical study.
Exp Cell Res. 1982; 141(2): 385-95.
- 220 **Sindic CJM, Chalon MP, Cambiaso CL, Laterre EC, Masson PL.** Assessment of damage to the central nervous system by determination of S-100 protein in the cerebrospinal fluid.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1982; 45: 1130-35.
- 221 **Smith GM, Miller RH, Silver J.** Astrocyte transplantation induces callosal regeneration in postnatal acallosal mice.
Ann N Y Acad Sci. 1987; 495: 185-206.
- 222 **Snyder SH.** Neuroscience. Vehicles of inactivation.
Nature. 1991; 354(6350): 187.
- 223 **Sonnevald U, Westergaard N, Schousboe A, Svendsen JS, Unsgard G, Petersen SB.** Direct demonstration by [¹³C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons.
Neurochem Int. 1993; 22(1): 19-29.
- 224 **Srebro Z.** Periventricular Gomori-positive glia in brains of X-irradiated rats.
Brain Res. 1971; 35(2): 463-8.
- 225 **Steiniger B, Meide PH van der.** Rat ependyma and microglia cells express class II MHC antigens after intravenous infusion of recombinant gamma interferon.
J Neuroimmunol. 1988; 19(1-2): 111-8.
- 226 **Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN.** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance.
Science. 1987; 235(4792): 1043-6.
- 227 **Stoll G, Muller HW.** Macrophages in the peripheral nervous system and astroglia in the central nervous system of rat commonly express apolipoprotein E during development but differ in their response to injury.
Neurosci Lett. 1986; 72(3): 233-8.
- 228 **Sugiyama K, Brunori A, Mayer ML.** Glial uptake of excitatory amino acids influences neuronal survival in cultures of mouse hippocampus.
Neuroscience. 1989; 32(3).

- 229 **Sun D, Wekerle H.** Ia-restricted encephalitogenic T lymphocytes mediating EAE lyse autoantigen-presenting astrocytes.
Nature. 1986; 320(6057): 70-2.
- 230 **Tanaka K.** Functions of glutamate transporters in the brain.
Neurosci Res. 2000; 37(1): 15-9.
- 231 **Tapscott SJ, Bennett GS, Toyama Y, Kleinbart F, Holtzer H.** Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord.
Dev Biol. 1981; 86(1): 40-54.
- 232 **Traub P, Vorgias Ce.** Involvement of the N-terminal polypeptide of vimentin in the formation of intermediate filaments.
J Cell Sci. 1983; 63: 43-67.
- 233 **Uhl GR.** Neurotransmitter transporters (plus): a promising new gene family.
Trends Neurosci. 1992; 15(7): 265-8.
- 234 **Uyeda CT, Eng LF, Bignami A.** Immunological study of the glial fibrillary acidic protein.
Brain Res. 1972; 37(1): 81-9.
- 235 **vanGeel WJ, deReus HP, Nijzing H, Verbeek MM, Vos PE, Lamers KJ.** Measurement of glial fibrillary acidic protein in blood: an analytical method.
Clin Chim Acta. 2002; 326(1-2): 151-4.
- 236 **Vass K, Lassmann H.** Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system.
Am J Pathol. 1990; 137(4): 789-800.
- 237 **Vaughn JE, Pease DC.** Electron microscopic studies of wallerian degeneration in rat optic nerves. II. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells.
J Comp Neurol. 1970; 140(2): 207-26.
- 238 **Wahl Sm, Allen JB, McCartney-Francis N, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Ellingsworth L, Mai UE, Mergenhagen SE, Orenstein JM.** Macrophage- and astrocyte-derived transforming growth factor beta as a mediator of central nervous system dysfunction in acquired immune deficiency syndrome.
J Exp Med. 1991; 173(4): 981-91.
- 239 **Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R.** Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83(9): 3012-6.
- 240 **Waterloo K, Ingebrigsten T, Romner B.** Neuropsychological function in patients with increased serum levels of protein S-100 after minor head injury. Acta Neurochir (Wien). 1997; 139: 26-32.
- 241 **Westermarck B, Wasteson A.** A platelet factor stimulating human normal glial cells. Exp Cell Res. 1976; 98(1): 170-4.
- 242 **Whittemore SR, Larkfors L, Ebendal T, Holets VR, Ericsson A, Persson H.** Increased beta-nerve growth factor messenger RNA and protein levels in neonatal rat hippocampus following specific cholinergic lesions. J Neurosci. 1987; 7(1): 244-51.
- 243 **Wiesmann M, Missler U, Gottmann D, Gehring S.** Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age and sex independent. Clin Chem. 1998; 44: 1056-8.
- 244 **Willmore LJ, Triggs WJ.** Iron-induced lipid peroxidation and brain injury responses. Int J Dev Neurosci. 1991; 9(2): 175-80.
- 245 **Woertgen C, Rothoerl RD, Holzschuh M, Metz C, Brawanski A.** Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. Acta Neurochir (Wien). 1997; 139: 1161-65.
- 246 **Woertgen C, Rothoerl RD, Wiesmann M, U U Missler, Brawanski A.** Glial and neuronal serum markers after controlled cortical impact injury in the rat. Acta Neurochir Suppl. 2002; 81: 205-7.
- 247 **Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW.** Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. Nature. 1984; 310(5979): 688-91.
- 248 **Yang ZW, Babitch JA.** Factors modulating filament formation by bovine glial fibrillary acidic protein, the intermediate filament component of astroglial cells. Biochemistry. 1988; 27(18): 7038-45.
- 249 **Yang ZW, Kong CF, Babitch JA.** Characterization and location of divalent cation binding sites in bovine glial fibrillary acidic protein. Biochemistry. 1988; 27(18): 7045-50.

- 250 **Yankner BA, Shooter EM.** The biology and mechanism of action of nerve growth factor.
Annu Rev Biochem. 1982; 51: 845-68.
- 251 **Yen SH, Dahl D, Schachner M, Shelanski ML.** Biochemistry of the filaments of brain.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1976; 73(2): 529-33.
- 252 **Yen SH, Fields KL.** Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system.
J Cell Biol. 1981; 88(1): 115-26.
- 253 **Yoshida K, Gage FH.** Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines.
Brain Res. 1992; 569(1): 14-25.
- 254 **Young JK, Garvey JS, Huang PC.** Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain.
Glia. 1991; 4(6): 602-10.
- 255 **Zimmer DB, Eldig LJ van.** The S-100 protein family History, function and expression.
Brain Res Bull. 1995; 37: 417-29.

13. Lebenslauf

Adresse: Olaf Magerkurth
Schlettstadterstrasse 36
CH-4055 Basel

Geburtsdatum: 11.12.1973 in München

Ausbildung

1980-1984	Grundschule
1984-1993	Gymnasium
09.07.1993	Abitur
Wintersemester 1993/94	Studium der Chemie
Sommersemester 1994	Beginn Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians Universität München
18.03.1996	Physikum
28.08.1997	Erstes Staatsexamen
08.09.1999	Zweites Staatsexamen
11.10.2000	Drittes Staatsexamen

Arzt im Praktikum

AIP im Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin	Februar -Juli	2001 2002
--	------------------	--------------

Assistenzarzt

Neurochirurgie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin	August	2002
Radiologie im Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin	Dezember -Februar	2002 2003
Radiologie im Kantonsspital Basel	seit März	2003